

**Elimination von Enteroviren und
Rotavirus-SA-11
aus Wasser und Abwasser bei der Filtration
durch Sandsäulen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Nasser Abdelfatah
Berlin 1984

Elimination von Enteroviren und Rotavirus-SA-11
aus Wasser und Abwasser bei der Filtration
durch Sandsäulen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Nasser Abdelfatah

Berlin 1984

1. Gutachter: P.D. Dr. J.M.Lopez
2. Gutachter: Professor Dr. R.E.Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung 6. September 1984

Diese Arbeit wurde im Bundesgesundheitsamt,
Institut für Wasser-,Boden- und Lufthygiene
angefertigt.

Herrn Prof.Dr.J.P. Lopez bin ich für die ständige
Betreuung, die Förderung und die zahlreichen
Diskussionen zu Dank verpflichtet.

Ebenso danke ich Herrn Prof. R.E.Lochmann
für seine Unterstützung. Ich danke allen
Mitarbeitern der Abteilung für Virologie;
insbesondere Frau E.Tischer, für die ständige
Hilfe und Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>EINLEITUNG.</u>	1
2.	<u>ALLGEMEINES.</u>	2
2.1	<u>Viren die im Wasser vorkommen können.</u>	2
2.1.1	Enteroviren.	2
2.1.2	Andere Viren.	4
2.1.2.1	Hepatitisviren.	4
2.1.2.2	Adenoviren.	6
2.1.2.3	Reoviren.	7
2.1.2.4	Rotaviren.	8
2.2	<u>Epidemiologie von Virenerkrankungen, die mit dem Wasser übertragen werden können.</u>	10
2.3	<u>Virusnachweis im Wasser.</u>	12
2.4	<u>Virenvorkommen im Abwasser.</u>	18
2.5	<u>Virenbeseitigung durch Abwasserbehandlungsverfahren.</u>	20
2.5.1	Vorklärung.	20
2.5.2	Biologische Abwasserbehandlung. (Sekundäre Abwasserbehandlung)	21

2.5.3	Klärung mittels einer dritten Stufe. (Tertiäre Behandlung)	22
2.5.4	Desinfektion.	23
2.6	<u>Virenvorkommen in Oberflächengewässern.</u>	25
2.7	<u>Virenvorkommen im Grundwasser.</u>	26
2.8	<u>Virenvorkommen im Trinkwasser.</u>	28
2.9	<u>Virenbeseitigung durch Sandfiltration.</u>	29
3.	<u>ZIEL DER ARBEIT.</u>	33
4.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	34
4.1	<u>Wasserarten.</u>	34
4.1.1	Grundwasser.	34
4.1.2	Biologisch behandeltes Abwasser.	34
4.1.3	Weitergehend behandeltes Abwasser.	36
4.1.4	Destilliertes Wasser.	37
4.2	<u>Zellen.</u>	37
4.2.1	BGM-Zellen.	37
4.2.2	Ma-104-Zellen.	37
4.3	<u>Testviren und Virenzüchtung.</u>	38

4.3.1	Züchtung der Viren in BGM-Zellen.	38
4.3.2	Züchtung des Rota SA-11-Virus in MA-104-Zellen.	39
4.4	<u>Virusnachweisverfahren.</u>	40
4.4.1	Plaque-Assay mit BGM-Zellen.	40
4.4.2	Plaque-Assay des Rota SA-11-Virus in MA-104-Zellen.	41
4.5	<u>Batchversuche.</u>	43
4.6	<u>Säulenversuche.</u>	44
4.7	<u>Material.</u>	48
5.	<u>VERSUCHE UND ERGEBNISSE</u>	50
5.1	<u>Überlebensdauer von Enteroviren im Grundwasser.</u>	50
5.2	<u>Einfluß des Salzes und der Temperaturbehandlung auf die Virusretention in Sand.</u>	54
5.2.1	Einfluß des Salzes.	54
5.2.2	Einfluß der Temperaturbehandlung.	55
5.2.3	Einfluß der Temperatur auf die Adsorption der Viren in Batch.	57
5.3	<u>Einfluß verschiedener Faktoren auf die Adsorption der Viren an Sand.</u>	61

5.3.1	<u>Batchversuche.</u>	62
5.3.1.1	Untersuchung der Adsorption zwischen Viren und Sedimentpartikeln.	62
5.3.1.2	Einfluß der Sandmenge und der Viruskonzentration.	63
5.3.1.3	Der Einfluß der Korngröße.	64
5.3.1.4	Einfluß des pH-Wertes.	64
5.3.1.5	Einfluß der Kationen.	65
5.3.1.6	Einfluß der Huminsäure.	66
5.3.2	<u>Transport von Viren in Sandsäulen unter verschiedenen Bedingungen.</u>	74
5.3.2.1	Einfluß der Wasserqualität auf die Eindringtiefe von Viren.	75
5.3.2.2	Einfluß der Fließgeschwindigkeit des Wassers auf den Transport der Viren.	78
5.3.2.3	Einfluß des Gesamtelutionsvolumens auf den Transport von Cox.-Bl-Viren.	81
5.3.2.4	Einfluß des pH-Wertes auf das Transport- verhalten von Cox.-Bl-Viren.	83
6.	<u>DISKUSSION DER ERGEBNISSE.</u>	91
	<u>SUMMARY</u>	104

Abbildungen

<u>Abbildung 1</u>	: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für die Säulenversuche.	47
<u>Abbildung 2</u>	: Inaktivierung von Enteroviren in unbehandeltem Grundwasser.	52
<u>Abbildung 3</u>	: Inaktivierung von Rota SA-11-Viren im Grundwasser, in mit Grundwasser überschichtetem Sand, in gesättigtem Sand.	53
<u>Abbildung 4</u>	: Die Elution von Polioviren I mit Hilfe destillierten Wassers.	58
<u>Abbildung 5</u>	: Der Einfluß von 2mM NaCl auf die Zurückhaltung von Polioviren I in der Säule.	58
<u>Abbildung 6</u>	: Der Einfluß der Temperaturbehandlung auf die Zurückhaltung von Polio I in der Säule.	59
<u>Abbildung 7</u>	: Der kombinierte Einfluß der Temperatur und 2mM NaCl auf die Zurückhaltung von Polioviren I in der Säule.	59
<u>Abbildung 8</u>	: Der Einfluß der Sandbehandlung mit verschiedenen Temperaturen auf die Adsorption der Polioviren I an den Sand.	60
<u>Abbildung 9</u>	: Adsorption von Polio I und Cox B1-Viren	67

an einem Gramm Sand (kleiner als
1mm) oder an einem Gramm kolloidaler
Partikel (kleiner als 0.02 mm)
in Abhängigkeit von der Zeit.

- Abbildung 10 : Prozentualer Anteil von adsorbierten 68
Cox A9 in Abhängigkeit der Sandmenge,
in der sie inkubiert wurden.
- Abbildung 11 : Wie Abb. 10, für Echo 7. 68
- Abbildung 12 : Wie Abb. 10, für Polio I. 69
- Abbildung 13 : *Wie Abb. 10, für Cox B1. 69
- Abbildung 14 : Freie, nicht adsorbierte Cox B1, 70
gegen gebundene Viren nach Inkubation
mit 1.5 g der unterschiedlichen
Sandfraktionen in 5 ml dest.
- Abbildung 15 : Einfluß der Korngröße auf die Adsorption 71
von verschiedenen Enteroviren in
dest. Wasser.
- Abbildung 16 : Einfluß des pH-Wertes auf die Adsorption 72
einiger menschenpathogener Enteroviren
an Sand.
- Abbildung 17 : Die Abhängigkeit der Adsorption 73
von Polioviren I von der Kationen-
wertigkeit.
- Abbildung 18 : Die Abhängigkeit der Adsorption 73
von Rota SA-11-Viren von der Kationen
wertigkeit.

<u>Abbildung 19</u> :	Der Einfluß von Huminsäure auf die Adsorption von Polioviren I an Sand.	74
<u>Abbildung 20</u> :	Prozentuale Verteilung von verschiedenen Viren in Säulen, die mit destilliertem Wasser eluiert wurden.	86
<u>Abbildung 21</u> :	Wie Abb.20, mit Grundwasser.	86
<u>Abbildung 22</u> :	Wie Abb. 20, mit weitergehend gereinigtem Abwasser.	87
<u>Abbildung 23</u> :	Wie Abb. 20, mit biologisch behandeltem Abwasser.	87
<u>Abbildung 24</u> :	Prozentuale Verteilung von Cox-B1 Viren entlang von Säulen, eluiert bei unterschiedlichen Abstandsgeschwindigkeiten mit dest.Wasser.	88
<u>Abbildung 25</u> :	Prozentuale Verteilung von Cox-B1 Viren entlang von Säulen, die mit unterschiedlichen Wassermengen eluiert wurden.	89
<u>Abbildung 26</u> :	Prozentuale Verteilung von Cox-B1 Viren entlang von Säulen in Abhängigkeit vom pH-Wert des eluierenden Wassers.	90

Tabellen

<u>Tabelle 1:</u> Im Wasser vorkommende human pathogenen Viren.	9
<u>Tabelle 2:</u> Die Zusammensetzung des Grundwassers.	35
<u>Tabelle 3:</u> Die Zusammensetzung des biologisch behandelten Abwassers.	35
<u>Tabelle 4:</u> Die Zusammensetzung des weitergehend behandelten Abwassers.	36
<u>Tabelle 5:</u> Einfluß des DAETA-Dextran und Trypsin auf die Zahl und Größe von Rota-SA-11-Plaques.	42
<u>Tabelle 6:</u> Einige Transportparameter in Abhängigkeit der Abstandsgeschwindigkeit.	46
<u>Tabelle 7a:</u> Eindringtiefe, Sickergeschwindigkeit, Rd-Wert und 50-Tage-Eindringtiefe von Cox.B1-Viren für die langsamsten 90 % der eingegebenen Viren.	79
<u>Tabelle 7b:</u> Wie in Tabelle 7a, aber für die langsamsten 80 99 % der Viren.	80
<u>Tabelle 8:</u> Transportparameter von Cox.B1-Viren in Abhängigkeit der durchgeflossenen Wassermenge.	82
<u>Tabelle 9:</u> Transportparameter für Cox.B1-Viren in Abhängigkeit vom pH-Wert des eluierenden Wassers.	85

1 Einleitung.

Mensch und Tier verbrauchen direkt oder indirekt Wasser. Einen großen Teil dieses Wassers geben sie durch das Ableitungssystem zusammen mit anorganischen und organischen Bestandteilen sowie mit pathogenen Mikroorganismen zurück, die mit den Ausscheidungen ausgetrennt werden.

Die Gesundheit des Menschen ist von Qualität und Quantität des Wassers abhängig. Die Weltbevölkerung nimmt jährlich im Durchschnitt um 2 % zu und verdoppelt sich alle 30 Jahre, so daß immer mehr Wasser aus Flüssen, Seen und Untergrund gewonnen werden muß, um die Zunahme des Wasserverbrauchs abzudecken, der jedes Jahr von neuem zusätzlich verursacht wird.

Durch das Wachstum der modernen Gesellschaft entsteht die folgende Situation: Es wird immer mehr Wasser verbraucht und gleichzeitig immer mehr Wasser kontaminiert.

Im Abwasser können mehr als 100 verschiedene human-pathogene Virustypen vorkommen, die in Flüssen und Seen sowie im Grundwasser nachgewiesen werden können (1,2,3,4). Obwohl die Virenübertragung durch das Wasser oft schwer zu erkennen ist, kann ihr Vorkommen in den verschiedenen Wasserarten nicht ignoriert werden.

Enteroviren sind in der Umwelt resistenter als E. Coli-Bakterien, die als Indikator für die fäkale

Verschmutzung des Trinkwassers dienen. Darüberhinaus braucht es keine Korrelation zwischen der Zahl der Coli-Bakterien und der Zahl der Viren zu geben. Deshalb können Wasserproben, die coliform negativ sind, dennoch Viren enthalten (5). Ein Beispiel für eine wasserübertragene virale Epidemie ist der Ausbruch der Seuche der infektiösen Hepatitis in Neu-Delhi im Jahre 1955, als ca. 30000 Menschen erkrankten, nachdem sie Wasser getrunken hatten, das mit Hepatitis A-Viren kontaminiert war (6).

Mehrere Verfahren werden verwendet, um Abwasser zu reinigen, bevor es flußabwärts in die Vorfluter (und zu der nächsten Gemeinde) fließen kann. Jedes zeigt Unterschiede in seiner Fähigkeit, Viren zu beseitigen. Aber sogar die Kombination aller Verfahren genügt nicht, um sämtliche Viren zu inaktivieren (7).

Untersuchungen ergaben, daß Enteroviren chlorresistenter sind als Bakterien (8). Darüberhinaus bleiben sie in der Umwelt lange infektiösfähig, so daß zu erwarten ist, daß sie Wasser häufiger kontaminieren als allgemein angenommen.

2. ALLGEMEINES.

2.1 Viren, die im Wasser vorkommen können.

2.1.1 Enteroviren.

Die Kontamination des Wassers mit Viren menschlichen Ursprungs tritt als Folge der Verunreinigung mit menschlichen Ausscheidungen auf. Als wichtigste Virengruppe gelten die Enteroviren. Wie der Name bereits andeutet, kommen Enteroviren vornehmlich

im Darm vor. Das Enteroviren-Genus besteht aus den folgenden Viren:

1. Poliovirus 1-3.
2. Coxsackievirus A1-24.
3. Coxsackievirus B1-6.
4. Echovirus 1-34.
5. Neue Enteroviren 68-71.

Die Enteroviren gehören der Familie Picornaviridae an (Pico= klein und RNA (rna)= ribonucleic acid). Die Enteroviren teilen gemeinsame klinische, epidemiologische, ökologische sowie physikalische und biochemische Eigenschaften.

Die gemeinsamen Kennzeichen der Enteroviren sind die Größe (20-30 nm Durchmesser) und der Gehalt an RNS, die einsträngig ist. Die Enteroviren haben keine Hülle, weil am Aufbau dieser Viren Lipide nicht beteiligt sind. Deswegen sind sie unempfindlich gegen Äther oder andere Lipidlösungsmittel. Sie reifen im Zytoplasma. Nach ihrer Adsorption an spezifische Rezeptoren an der Zellmembran penetrieren sie in die Zelle, und die virale RNS wird freigesetzt. Die einsträngige RNS der Enteroviren dient als ihre eigene mRNS. Diese mRNS wird übersetzt durch die Anlagerung an die Zellribosomen, von denen jetzt virale RNS-Polymerase hergestellt wird. Die RNS-Polymerase ist für die Synthese der doppelsträngigen Replikationsform verantwortlich . Kurz nach der Infektion wird die zelluläre RNS- und Proteinsynthese blockiert. Aus der replikativen Form werden einsträngige virale RNS-Moleküle syntheti-



siert. Die neuen einsträngigen Moleküle können eine von den folgenden Funktionen erfüllen. 1. Sie können als mRNS für die Proteinsynthese dienen. 2. Sie können als Template für die Bildung neuer Replikationsformen dienen. 3. Sie werden mit Proteinen umhüllt und werden als reife Virionen nach Zellyse in der Umgebung freigesetzt.

Durch ihre Säurestabilität können die Enteroviren das saure Milieu des Magens überleben. Sie verursachen beim Menschen unterschiedliche Krankheiten. Die meisten Enteroviren besitzen eine Affinität zum Darmtrakt und zum ZNS (Tabelle 1), dabei handelt es sich häufig um subklinische Krankheiten. Verschiedene Viren können die gleichen Symptome hervorrufen; das gleiche Virus kann allerdings auch mehr als ein Symptom verursachen. Deshalb kann die klinische Symptomatik keine befriedigende Basis für die Klassifizierung der Enteroviren sein.

2.1.2 Andere Viren.

In menschlichen Ausscheidungen können andere Virengruppen nachgewiesen werden und von epidemiologischer Bedeutung im Wasser sein.

2.1.2.1 Hepatitisviren :

Klinische, immunologische und epidemiologische Beobachtungen ließen die Definition zweier Typen von Erkrankungen zu (9).

1. Virus-Hepatitis Typ A.

Es ist ein einsträngiges RNS-Virus, das nach seiner Größe und Dichte als Picornavirus klassifiziert

wird (10). Das Hepatitis A-Virus wird auf fäkal-oralem Wege übertragen, insbesondere bei ungünstigen sanitären Bedingungen bei engem Kontakt mit infizierten Personen. Es wird mit den menschlichen Exkrementen ausgeschieden (15). Seuchenbeobachtungen ergaben, daß das HVA auch durch das Wasser übertragen werden kann.

Die größte durch Trinkwasser übertragene Hepatitis-epidemie kam 1955 in New Delhi auf. Sie wurde durch die Kontamination der Wasserversorgung (Fluß) mit Abwasser verursacht (6).

Die Morbidität der Hepatitis A ist unterschiedlich und beträgt weniger als 1 % mit durchschnittlicher Inkubationszeit von 25-30 Tagen. Fieber, Übelkeit und Abdominalbeschwerden sind charakteristische klinische Symptome für akute Hepatitis-erkrankungen.

2. Virus-Hepatitis B.

Das Serumhepatitis B Virus hat eine doppelsträngige DNS, sein Durchmesser beträgt 27 nm.

Die Virusübertragung findet normalerweise auf dem parenteralen Wege statt. Da das Hepatitis B-Ag (Antigen) in Fäkalienmaterial und Urin nachgewiesen wurde, ist zu erwarten, daß das Virus auch im Abwasser vorkommt und auf dem Wasserwege übertragen werden kann, obwohl es bisher in Fäkalienmaterial von Erkrankten nicht nachgewiesen wurde (12).

2.1.2.2 Adenoviren.

Sie sind doppelsträngige DNS-Viren, mit einem Durchmesser von 60-90 nm. Die Synthese der Adenovirus-DNS und die Komplettierung mit dem Kapsid erfolgen im Zellkern, wo Viria häufig in einer kristallinen Ordnung bis zur Zellzerstörung bleiben. Die Adenovirusreplikation übt keinen Hemmeffekt auf die zelleigenen Synthesemechanismen bis in die späte Zyklusphase aus. Die Translation der virusspezifischen mRNS findet im Zytoplasma statt, danach folgt die Bildung der DNS-Vorläufer und der DNS sowie die Bildung der Strukturproteine und Reifungsfaktoren.

Es wurden 33 Adenovirustypen isoliert, die beim Menschen Infektionen verursachen. Sie verursachen Infektionen im Respirations- und Intestinaltrakt. Die häufigsten Krankheitsbilder sind Infektionen der oberen, seltener der unteren Luftwege und gastrointestinale Symptome. Die Darminfektion ruft eine leichte Krankheit hervor (13). Die durchschnittliche Inkubationszeit der Adenoviren beträgt 6 Tage. Durch infektiöse Ansiedlung im Darm werden die Adenoviren in großen Mengen mit den menschlichen Exkrementen ausgeschieden und können auf dem Wasserwege übertragen werden.

In Kindergärten und in Familien spielen die fäkal-oralen Wege die wichtigste Rolle bei der Übertragung von Adenoviren. Respirationsübertragung von Adenovirus ist möglich, wenn akute Respirationskrankheiten auftreten. Insbesondere in klein Einrichtungen ist die Respirationsübertragung zu beachten.

Es wurde ein Zusammenhang zwischen Adenovirenerkrankungen und Benutzung von öffentlichen Schwimmbädern beobachtet, zusätzlich wurde Adenovirus in Abwasser und Schwimmbädern nachgewiesen (14,15).

2.1.2.3 Reoviren.

Sie sind doppelsträngige RNS-Viren mit einem Durchmesser von 75-80 nm. Die RNS der Reoviren und anderer doppelsträngiger RNS-Viren besteht aus einem Spektrum von ca. 10 einzelnen RNS-Molekülen (Segmenten). Die Virusvermehrung findet im Zytoplasma statt. Anscheinend wird das Virion mit intaktem Kapsid von der Zelle aufgenommen. Die doppelsträngige RNS des Reovirus kann die Rolle der mRNS nicht spielen, deshalb muß sie entweder in einzelstränge getrennt oder kopiert werden. Die zur RNS-Synthese notwendigen Enzyme sind im Reovirion vorhanden, d.h. die mRNS-Synthese findet im Virionkern statt. Die doppelsträngigen RNS-Moleküle bleiben während der RNS-Synthese im Virionkern, aus dem neue einzelsträngige RNS-Moleküle gebildet und vom Virion freigesetzt werden. Die einzelsträngigen RNS-Moleküle haben heterogene Größen und fungieren als virale RNS. Die Reoviren reifen im Zytoplasma und bleiben dort als reife Viria bis zur Zellyse.

Beim Menschen verursachen die Reoviren eine Respirationstrakt- und Darminfektion. Die Symptome sind uncharakteristisches Fieber, Rhinitis oder Durchfall. Die Isolierung der Reoviren gelingt sowohl aus Kranken als auch aus Gesunden, deshalb sind die Reovireninfektionen schwer zu erkennen.

Der Respirationstrakt und der Darm sind die natürlichen Infektionswege der Reoviren. Die mit den menschlichen Exkrementen ausgeschiedenen Viren können auf dem

Wasserwege übertragen werden.

2.1.2.4 Rotaviren.

"Rota" bezieht sich auf das lateinische Wort rota= Rad; ihre äußere Kapsel sieht wie ein Kreis aus. Sie sind doppelsträngige RNS-Viren mit einem Durchmesser von 70 nm und einer Doppelkapsel. Ihr Genom besteht aus 11 einzelnen RNS-Molekülen, was sie von den Reoviren unterscheidet. Die Vermehrung und Reifung der Rotaviren findet im Zytoplasma statt. Von den humanen Rotaviren wurden nur sehr wenige Stämme in begrenzten Mengen in Zellen kultiviert, und nur ein kleiner Prozentsatz der Zellen wurde infiziert (16). In letzter Zeit wurde humanes Rotavirus Wa adaptiert, in Nierenzellen von afrikanischen Affen zu wachsen. Bis jetzt wurden die Affenrotaviren als Modell für die humanen Rotaviren in Untersuchungen benutzt.

Die humanen Rotaviren sind für 30-60 % der Gastroenteritiserkrankungen bei Kindern verantwortlich (17). Nach klinischen Untersuchungen wurde die Inkubationszeit der Rotavirenerkrankungen auf weniger als 48 Stunden geschätzt (18).

Wie die anderen genannten Viren wird auch das Rotavirus auf fäkaloralem Wege übertragen. Das Rotavirus ist gegen die Umweltbedingungen stabil. Deshalb kann kontaminierte Wasserversorgung zu ihrer Übertragung beitragen.

Tabelle (1). Im Wasser vorkommende humanpathogene Viren (19,20).

<u>Virusgruppe</u>	<u>Anzahl der Serotypen</u>	<u>Hervorgerufene Krankheiten</u>
<u>Enteroviren</u>		
Poliovirus	3	Kinderlähmungen, Meningitis, Fieber
ECHO-Virus	34	Atemwegserkrankungen, Durchfall, Fieber, Lähmungen, Myocarditis, Meningitis
Cox A-Virus	24	Meningitis, Herpangina, Durchfall, Atemwegserkrankungen
Cox B-Virus	6	Myocarditis, Pleurodynia, Pericarditis, Fieber, Atemwegserkrankungen
Neue Enteroviren	4	Fieber, Enzephalitis, Atemwegserkrankungen, Meningitis
Adenovirus	31	Akute Konjunktivitis, Augeninfektion, Atemwegsinfektion
Reovirus	3	Gastroenteritis
Rotavirus	13	Infantile Gastroenteritis
Hepatitis-virus	2	Infektiöse Hepatitis, Fieber, Durchfall

2.2 Epidemiologie von Virenerkrankungen, die mit dem Wasser übertragen werden können.

Enterovirenerkrankungen kommen überall auf der Welt vor. In tropischen und semitropischen Gebieten sind sie das ganze Jahr hindurch vertreten. Im gemäßigten Klima treten sie im Winter und Frühling auf, im Sommer kommen sie besonders häufig vor (21).

In den wärmeren Monaten und gewöhnlich bei Fehlen jeglicher Krankheit können menschliche Enteroviren in 5-60 % der entnommener Stuhleproben von kleinen Kindern nachgewiesen werden, und zwar abhängig von den sanitären Verhältnissen in der jeweiligen Bevölkerungsgruppe (7).

Eine beträchtliche Verminderung der Poliomyelitis, die auf der ganzen Welt Epidemien zur Folge hatte, wurde nach der Einführung der Polio-impfung im Jahre 1955 erreicht. In den USA wurden von 1951-1955 38000 Poliomyelitis-Erkrankungen mit Beteiligung des ZNS beobachtet. Darunter waren 16000 Lähmungsfälle, während zwischen 1961-1965 der jährliche Durchschnitt 570 Poliomyelitis-Erkrankungen betrug, davon 460 Lähmungsfälle. Über ähnliche Verminderungen wurde in vielen Staaten berichtet (21).

Coxsackieviren- und Echovirenepidemien fanden häufig in unterschiedlichen Gebieten und Jahren statt (22).

Enteroviren sind extrem ansteckende Viren. Sie kommen häufig in Großfamilien mit niedrigem sozio-ökonomischem Stand vor, so daß die erste Infektion

mit einem gegebenen Virus von Bedeutung ist, weil die folgende Ausbreitung auf die anderen empfänglichen Familienmitglieder erwartet werden kann. Eine schnelle und umfassende Ausbreitung der Enteroviren kann auch in Kindereinrichtungen und Sommerlagern stattfinden (23,24).

Viele Enteroviren können aus dem Oropharynx und dem Darm infizierter Personen gewonnen werden. Die fäkale Verschmutzung ist häufig die Quelle der Infektion. Jedoch können Tropfen oder Aerosole von Husten und Niesen ein Weg der direkten oder indirekten Übertragung sein (25,26).

Während einer Epidemie können kontaminierte Hausfliegen als mechanische Träger der Enteroviren auftreten. Häusliche Abwässer können dabei die Kontaminationsquelle der Fliegen sein.

In der Ausbreitung der Enteroviren spielt Wasser überhaupt eine große Rolle: Viele Autoren haben als Ursache für Epidemien kontaminiertes oder ungenügend behandeltes Wasser festgestellt (27,28,29, 30,31,32).

Obwohl es viele Daten über das Vorkommen der Enteroviren im Wasser in der Literatur gibt, ist es schwierig, eine Epidemie auf die Wasserversorgung zurückzuführen. Die Schwierigkeiten liegen an dem Verhalten der Enteroviren:

1. Der Teil der Personen, die klinische Symptome entwickeln, ist gering. Eine Infektion ohne klinische Symptome ist möglich und die Trägerpersonen können die Viren weiter übertragen.
2. Die Inkubationszeit desselben Virus kann zwischen

3-35 Tagen schwanken.

3. Dasselbe Virus kann mehr als ein Symptom verursachen.

Das infektiöse Hepatitisvirus verursacht eine Gelbsucht, deshalb sind Hepatitisepidemien leichter als Enterovirenepidemien zu erkennen. Zwischen 1895-1964 wurde von über 50 Hepatitisepidemien berichtet, die als Folge des Trinkens von kontaminiertem Wasser betrachtet wurden (33).

2.3 Virusnachweis im Wasser.

Es gibt bis jetzt keine geeignete verfügbare Methode, die das Vorkommen aller im Wasser auftretenden humanpathogenen Viren signalisieren kann.

Die mit dem Virusnachweis- und Bestimmungsverfahren im Wasser verbundenen Probleme sind : 1. die geringe Größe des Viruspartikels (25-100 nm), 2. die niedrige Viruskonzentration im Wasser und die unterschiedliche Menge der Virustypen, die im Wasser vorkommen können, 3. die Empfindlichkeit der Viren als biologische Wesen, 4. die Qualität des getesteten Wassers in Bezug auf seine physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften, 5. die begrenzten Virusbestimmungs- und Identifikationsverfahren.

Da die Viren in natürlichen Wässern in kleinen Mengen auftreten, wird meistens bei virologischen Untersuchungen eine Anreicherung der Viren im Wasser durch Ultrafiltration (34), Ultrazentrifugation (35), Filter-Adsorption-Elution (36) oder Phasentrennung (37) der eigentlichen Isolierung

vorgeschaltet.

Die Virusnachweis- und Bestimmungsverfahren können in drei Schritten zusammengefaßt werden : 1. die Sammlung einer repräsentativen Wasserprobe, 2. die Konzentrierung der Viren in der Probe, 3. die Untersuchung und Identifizierung der angereicherten Viren. Moderne technische Fortschritte führten zur Entwicklung von wirksamen und zuverlässigen Viruskonzentrierungsmethoden.

Die Membranfiltrationstechnik ist das häufigste verwendete Verfahren für die Anreicherung von Viren aus größeren Wasservolumina. Sie ist die schnellste und günstigste sowie billigste Methode von den bisher untersuchten Anreicherungsverfahren (38).

Die Viren können aufgrund von elektrostatischen, hydrophobischen und anderen Kräften an Filter adsorbieren (39). Die Virusadsorption kann durch das Vorhandensein von Salzen gefördert werden und ist von deren Kationenwertigkeit abhängig (40). Das Auftreten von organischen Stoffen in verschmutzten Wasser kann die Virenadsorption stören (41).

Für die Virusdesorption vom Filter werden häufig Proteinsuspensionen bei hohen pH-Werten benutzt. Am meisten werden Glycinpuffer pH 11.5 oder Fleischextrakt pH 9 beim Anreicherungsverfahren verwendet. Die Elution mit Fleischextrakt pH 9 und die anschließende organische Flockung (durch pH-Senkung entstehen Flocken in der Suspension) zeigten bessere Gewinnungsraten als die Glycinpufferelution (42).

Um einen geeigneten Filter für die Anreicherung

von Viren in größeren Wasservolumina (380 l) zu wählen, haben Jakubowski et al (43) vier verschiedene Filter nach ihren Wiedergewinnungsraten untersucht.

Die getesteten Filter waren :

1. Zellulosenitrat Filter, 293 mm Durchmesser, flacher Filter, Millipore corp.
2. Fiberglass-Asbestos-Epoxy, 267 mm Durchmesser, flach, Series AA, Typ M-780, Cox Instrument Div.
3. Fiberglass yarn-wound Patronenfilter, Typ K-27, Carbondum Co.
4. Fiberglass-Epoxy Rohrfilter, Balston, Inc.

Die getesteten Filter sind elektronegativ geladene Filter, so daß für die Virusadsorption eine pH-Senkung des untersuchten Wassers auf 3.5 notwendig war. Es ergab sich kein großer Unterschied zwischen den Gewinnungsraten der verschiedenen Filter. Der Balstonfilter wurde als geeignetster Filter für die Viruskonzentrierung von größeren Wasservolumina für Routineverfahren vorgeschlagen.

Ein ähnlicher Vergleich zwischen den verschiedenen Filtern wurde bei Hill et al (44) mit Leitungswasser durchgeführt. Sie reicherten Poliovirus I aus 44 Wasserproben (380 l) an und erzielten durchschnittliche Gewinnungsraten von 95 %.

Der Zusatz von Salzen (AlCl_3 und MgCl_2) wird für die Verstärkung der Adsorption empfohlen.

Die Elution der Viren vom Filter wurde entweder mit 0.05 M Glycin-NaOH, pH 11.5, oder mit Fleisch-extrakt, pH 9, erzielt. Bei der Anwendung von Glycin ist eine Rekonzentrierung der Viren an einem Fiberglass-Asbestos-Epoxy Filter (Cox) mit kleinem Durchmesser erforderlich und bei Fleisch-extrakt folgt eine Präzipitation bei pH 3.5 (organische Flockung).

Diese Methoden sind für die Anreicherung von Viren aus bis zu mehreren hundert Litern Wasser geeignet und können bei Felduntersuchungen verwendbar sein.

Für die Konzentrierung von Viren aus trübem Wasser wurde ein Membranfiltrationsverfahren beschrieben (45). Die Methode ist für die Filtration von 20 l trübem Wasser geeignet. Die verwendeten Filter können Zelluloseacetat oder Fiberglass-Asbestos-Epoxyfilter sein. Die Adsorption wird in Gegenwart von 0.0005 M $AlCl_3$, pH 3.5, oder $MgCl_2$, pH 3.5-6, durchgeführt.

Sobsey und Jones (46) führten die elektropositiven Filter für die Viruskonzentrierung in Wasser ein. Die positiv geladenen Filter Zeta Plus adsorbierten Poliovirus I bei einem breiteren pH-Bereich als die negativ geladenen Filter. Durch Elution mit Glycin-NaOH, pH 9.5-11.5 erzielten sie eine durchschnittliche Wiedergewinnungsrate von 64 % aus 12 l Wasser. Bei der Anreicherung von Viren aus größeren Wasservolumina wurden mit positiv geladenen Filtern 20-25 % Gewinnungsraten erreicht, während die Gewinnungsraten mit Cox Fiberglass-Epoxy-Asbestosfilter bei 2-4 % lagen.

Viren wurden aus 19 l Belebtschlamm durch Zeta Plus und MDS Patronenfilter, ohne Wasserkonditionier-

ung, filtriert (47). Die Elution wurde mit 4 M Urea- 0.05 M Lysine pH-9 durchgeführt. Die Wieder-
gewinnungsraten der ersten Konzentrierungsstufe
waren 98 % für Poliovirus I und 87 % für Coxsackie
B-Viren. Nach der zweiten und dritten Konzentrierungs-
stufe wurde ein Anreicherungsfaktor von 15,200-23,750
erzielt und eine durchschnittliche Gewinnung von
49 % und 45 %. Die zweite und dritte Konzentrierungs-
stufen bestand in der anorganischen Flockung mit
 AlCl_3 , die von einer organischen Flockung mit
Fleischextrakt gefolgt wurde.

Gerba et al (48) erzielten die gleichen Gewinnungsraten
mit flachem Filtrite-Filter. Sie konzentrierten
Poliovirus aus 19-190 l Belebtschlammabwasser
und erreichten eine Gewinnungsrate von 50 %. Der
Vorteil der Zeta-Plus und MDS-Filter liegt an
ihrer Verwendbarkeit im pH-Bereichen von natürlichen
Wässern. Der Seitz-Filter (positiv geladene Asbestos
Zellulose) konnte Polioviren aus Leitungswasser
im pH-Bereich von 3.5-9.0 adsorbieren.

Außer dem Membranfiltrationsverfahren wurden für
die Viruskonzentrierung andere Methoden untersucht:

a. Ultrafiltration.

Bei diesem Verfahren wird die Wasserprobe durch
einen kleinporigen Filter unter Druck filtriert,
die Porengröße des Filters ist genügend klein
um kleine Partikel (u.a. Viren) zurückzuhalten.
Die Verwendung der Methode ist dadurch begrenzt,
daß der Filter schnell verstopft wird, so daß
die Viruskonzentrierung aus größeren Wasservolumina
lange Zeit braucht; insbesondere bei der Viruskonzent-
rierung aus natürlichen Wässern, in denen organische

Bestandteile häufig auftreten.

Nupen et al (49) konnten 100 l Wasser mit der Methode filtrieren, aber die Filtrationszeit war sehr lang (40 bis 72 Stunden für 50 l Wasser). Die beiden Nachteile: Verstopfung und die lange Filtrationszeit schränken die Verwendung dieser Methode bei Felduntersuchungen ein.

b. Ultrazentrifugation.

Wegen der geringeren Größe von Viren wird eine Zentrifugationskraft von 60,000 g für eine Stunde für ihre Sedimenttierung benötigt. Am häufigsten wird die Wasserprobe zunächst bei geringen Geschwindigkeiten zur Sedimentierung von großen Partikeln (u.a. Bakterien) zentrifugiert und anschließend wird sie bei höheren Geschwindigkeiten für das Absetzen von Viruspartikeln zentrifugiert. Anderson et al (35) haben ein Zentrifugationssystem für die Gewinnung und Trennung von Viren aus größeren Wasservolumina entwickelt. Die Kosten und die Handhabungsschwierigkeiten begrenzen die routinemäßige Verwendung der Methode.

c. Phasentrennung.

Eine Polymermischung wie Dextransulfat und Polyethylenglycol wird im Wasser in Phasen getrennt. Die in der Suspension vorhandenen Partikel und Makromoleküle werden nach Größe und Oberflächeneigenschaften getrennt (37). Die Viruskonzentrierung wird dadurch erreicht, daß eine Polymerlösung in einem bestimmten Verhältnis zur Virussuspension zugegeben wird, so daß die Viren in kleinen Volumina in der unteren

Phase konzentriert und getrennt werden (50). Die Methode ist für begrenzte Wasservolumina verwendbar, aber für Felderuntersuchungen nicht geeignet.

2.4 Virenvorkommen im Abwasser.

Um die mögliche Kontamination von verschiedenen Wasserquellen durch Viren herauszufinden, ist es wichtig, die Virenkonzentration im Abwasser und im behandeltem Abwasser zu bestimmen. Im Abwasser wurden Viren wiederholt nachgewiesen. Die Virenkonzentration im Abwasser ist von hygienischen Verhältnissen, jahreszeitlichen Differenzen und geographischen Gegebenheiten abhängig.

Buras (2) hat die Viruskonzentration in einer Kläranlage zwei Jahre lang untersucht. Sie fand die höchste Konzentration zwischen April und September. Im Juli wurden im Rohabwasser 10^6 PFU*/l und im August in behandeltem Abwasser (Belebtschlammverfahren) $9.4 \cdot 10^5$ PFU/l Viren ermittelt. Die Virenkonzentration in den Wintermonaten war geringer und betrug $6 \cdot 10^3$ PFU/l.

Eine ähnliche Studie wurde von Roger et al (51) durchgeführt. Sie wiesen in allen getesteten Proben Viren nach. Die Virenkonzentration schwankte zwischen 27- 19000 PFU/l. Die Viren wurden in 76 % der behandelten Abwasserproben (Belebtschlammverfahren) in Konzentrationen zwischen 7-5222 PFU/l ermittelt. Nach Chlorung waren 58 % der Abwasserproben virenpositiv mit Konzentrationen zwischen 2- 750 PFU/l. Die von Rao et al (52) ermittelte Virenkonzentration im Abwasser war niedriger und schwankte zwischen

* PFU = Plaque Forming Unit

300- 2542 PFU/l. Eine Viruskonzentration von 7000 PFU/l gilt als Mittelwert für Abwasser (53).

Lousise et al (54) isolierten in einer Jahresstudie Enteroviren, Adenoviren und Reoviren aus einer Kläranlage (Belebtschlamm). Sie wiesen im Abwasser eine durchschnittliche Konzentration an Enteroviren von 1400 IU/l (IU = Infection unit), an Adenovirenkonzentration von 1950 IU/l und an Reoviren von 2150 IU/l nach. Nach dem Belebtschlammverfahren nahm die Konzentration der Enteroviren bis zu 100 IU/l im Durchschnitt ab. Eine Adenovirenabnahme wurde auch festgestellt. Ihre Durchschnittskonzentration lag bei 250 IU/l und wurde in 23 Proben ermittelt. Die Reovirenkonzentration war höher als die der anderen Gruppen, im Durchschnitt 1500 UI/l und wurde in 22 von 26 Proben ermittelt.

Die virologischen Untersuchungen von Abwasser können Informationen über Die Ausbreitung von Enteroviren in der Bevölkerung geben. Durch Untersuchung von 46000 Stuhl- und 2000 Abwasserproben konnte ein Zusammenhang zwischen der Konzentration und Population der Viren im Stuhl und im Abwasser festgestellt werden (55). Während die Coxsackieviren aus Abwasser- und Stuhlproben etwa gleich häufig nachgewiesen wurden, waren die Echoviren aus Abwasser prozentual wesentlich häufiger.

Das nachweisbare Virusspektrum im Abwasser ist jahreszeitlich veränderlich. Die Vielfalt der im Abwasser vorkommenden Viren war in den Spätsommermonaten am höchsten, während in den Wintermonaten

weniger Virustypen vorkamen (55).

2.5 Virenbeseitigung durch Abwasserbehandlungs- verfahren.

Alle verwendeten Abwasser- und Wasserbehandlungsverfahren entfernen Viren aus dem Wasser. Die Effektivität der Behandlungsverfahren bei der Beseitigung oder Inaktivierung der Viren aus dem Wasser ist allerdings unterschiedlich.

2.5.1 Vorklärung.

Die Vorklärung ist das häufigste Abwasserbehandlungsverfahren. Die Beseitigung der Viren durch das primäre Absetzen hängt von der Rückhaltezeit ab. In den meisten Anlagen beträgt die Absetzungsdauer nur wenige Stunden, so daß durch die mechanische Vorklärung und Absetzung nur eine kleine Virenmenge beseitigt wird.

Clark et al (56) mischten Poliovirus I mit Abwasser und untersuchten die Effektivität der Beseitigung während der Vorklärung. Ein Drittel bis zwei Drittel der Viren verblieben nach 24 Stunden im Auslauf, während 75 % der suspendierten Teilchen sich im Sediment absetzten. Nach 3 Stunden wurde keine Virusentfernung festgestellt.

Andere Autoren stellten ebenfalls fest, daß die Vorklärung keine Verringerung in der Virusmenge im Abwasser verursacht (57,58).

2.5.2 Biologische Abwasserbehandlung (sekundäre Abwasserbehandlung).

Bei dieser Reinigungsstufe werden biologische Verfahren wie Tropfkörper und Oxidationsteiche oder das Belebtschlammverfahren verwendet.

Die Wirkung von Tropfkörpern beim Zurückhalten von Viren im Abwasser ist gering (59). Shuval et al (60) wiesen 16-100 % der im Zulauf vorhandenen Viren im Filterablauf nach. Andere Autoren berichteten über schlechtere Beseitigungsraten von Tropfkörpern (61).

Die Entfernung von Viren aus dem Abwasser bei der Oxidationsteichbehandlung hängt von der Retentionszeit ab. Speicherung von Abwasser in Teichen setzt die Viren chemischen Faktoren, UV-Strahlen und Adsorptionsteilchen aus. Shuval et al (60) berichteten über Beseitigungsraten von 0-96 % der im Abwasser vorhandenen Viren in Oxidationsteichen mit einer Rückhaltezeit von 20 Tagen. England et al (62) wiesen in 20 % von 87 Oxidationsteichablaufproben Viren nach. Die Teiche wurden mit Belebtschlammablauf mit niedrigen Virenmengen gefüllt.

Das Belebtschlammverfahren scheint die beste Abwasserreinigungsmethode zu sein, mit dem sich Viren aus dem Abwasser herausholen lassen (52). Clarck et al (64) stellten fest, daß die Vireneseitigungsraten durch Belebtschlamm von der suspendierten Teilchenkonzentration abhängig ist, so daß die

Poliovirus I -Beseitigung von 79 % auf 94 % stieg, als die Teilchenkonzentration von 200 auf 4000 mg/ml erhöht wurde. Ihre Untersuchungen ergaben, daß die Enteroviren durch Belebtschlamm unterschiedlich wirksam beseitigt wurden.

Kelly et al (63) beobachteten die Beseitigung von Poliovirus I und Coxsackievirus B5 aus Abwasser durch das Belebtschlammverfahren und erzielten 94-99 % Beseitigungsraten.

Es hat sich gezeigt, daß absetzbare Stoffe, Kolloide, toxische Substanzen und die Belüftung wichtige Faktoren sind, die die Beseitigung von Enteroviren aus dem Abwasser durch das Belebtschlamm beeinflussen (56,63).

2.5.3 Klärung mittels einer dritten Stufe (tertiäre Behandlung).

Koagulation wird für die Beseitigung von suspendierten Teilchen, Farben und Phosphaten sowie Bakterien und Viren aus dem Wasser verwendet. Sie wird häufig mit Hilfe von Aluminiumdisulfat $Al_2(SO_4)_2$, Calciumhydroxid $Ca(OH)_2$, Eisensalzen und Polyelektrolyten durchgeführt. Gute Virusbeseitigung ist von einer guten Flockenbildung abhängig, die wiederum von einer adäquaten Koagulantenkonzentration, dem Fehlen von störenden Stoffen, dem geeigneten pH-Wert und einer geeigneten Durchmischung abhängig ist (7).

Die Virusbeseitigung aus dem Wasser durch Koagulation scheint Folge einer Metall-Kation-Proteinreaktion zu sein, bei der ein Virus-Metallkomplex aufgebaut und präzipitiert wird (64).

Chang et al (65) entfernten 95-99 % des Coxsackievirus A2 durch Ausflockung mit 60-100 mg Aluminium/l. Bei zweistufiger Ausflockung wurden 99.9 % der Viren beseitigt.

Durch Präzipitation mit 400-500 mg/l Ca(OH)_2 wurden 99-99.9% der im primären behandelten Abwasser geimpften Polioviren entfernt. Bei Koagulation mit Ca(OH)_2 spielt der alkalische pH-Wert eine wesentliche Rolle in der Inaktivierung. Beim pH-Wert 11.1 wurden 90-99 % der Viren nach 90 min Kontaktzeit beseitigt (66).

Ähnliche Beseitigungsraten wurden durch die Anwendung von Eisensalzen FeCl_3 und $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_2$ im Koagulationsverfahren erreicht (7). Manwaring et al (67) entfernten 99.7 % der im Wasser vorhandenen Viren durch Koagulation mit Eisenchlorid.

Als Flockungsmittel wurden auch Polyelektrolyte untersucht. Chandhuri et al (61) entfernten 99.9 % des Coliphagen T_4 und 99-99.6 % des Coliphagen MS_2 aus deionisiertem Wasser mit künstlichen kationischen Polyelektrolyten.

2.5.4 Desinfektion.

Für die Abwasserentkeimung wird als Desinfektionsverfahren häufig Chlorung angewendet, weil es bis jetzt kein besseres Desinfektionsmittel gibt, das wie Chlor die Hygiene und Sicherheit sowie ökonomische Bedürfnisse abdeckt (68).

Die Geschwindigkeit der Virusinaktivierung durch Chlorung ist von dem Virusstamm, der Temperatur, der Konzentration an Restchlor, dem pH-Wert und

dem Gehalt an organischen Substanzen abhängig (69). Obwohl die Chlorhydrolyse im Wasser die Bildung von HOCl zur Folge hat, tritt Chlor in alkalischen Wasserbedingungen als OCl^- auf. Bei Anwesenheit organische Substanzen im Wasser kommt Chlor als Chloramin vor (70,71).

Liu und McGowan (72) beobachteten die Inaktivierung von 25 Humanenteroviren durch Chlorung und stellten fest, daß die erforderliche Zeit zur Inaktivierung von 99.9 % der Viren von 2.7 min für Reovirus bis über 120 min für Coxsackievirus A9 schwankt.

Bei alkalischem pH-Wert tritt Chlor als Hypochlorit OCl^- auf. Während 1 mg/l HOCl 99.6 % Coxsackieviren A2 in ca. 100 s bei 27-29°C inaktiviert und in ca. 7 min bei 3-6°C, braucht die gleiche Hypochlorit-Konzentration, um die gleiche Virusmenge zu inaktivieren, ca. 3.5 min bei 27-29°C und ca. 30 min bei 3-6°C (73).

Die im Abwasser vorhandenen organischen Substanzen, an die die Viren adsorbieren und in die sie eingeschlossen werden, können als Schutzmechanismen für die Viren fungieren. Eine vierfache Restchlorerhöhung war erforderlich, um eingeschlossene Viren wie freie Viren zu inaktivieren (74).

Da gereinigtes Abwasser nicht von organischen Substanzen und Ammoniak frei ist, kann das Chlorverfahren die im Abwasser auftretenden pathogenen Viren nicht vollständig inaktivieren (59).

2.6 Virenvorkommen in Oberflächengewässern.

In vielen Orten auf der Welt werden behandelte oder unbehandelte Abwässer in Flüsse und Seen sowie ins Meer abgeleitet. Dadurch werden sie unter anderem auch mit Enteroviren kontaminiert. Dabei handelt es sich um Viren die lange Zeit im Wasser infektiösfähig persistieren können (2-200Tage) (75), so daß sie in natürlichen Gewässern eine beträchtliche epidemiologische Gefahr darstellen können.

Das Vorkommen pathogener Enteroviren im natürlichen Wasser hängt von der Abwasserbelastung der Gewässer ab. Die Verbesserung der Nachweis- und Anreicherungsverfahren für im Wasser vorhandenen Viren ermöglichten deren regelmäßige Isolierung sowohl aus Abwasser als auch aus Oberflächenwasser.

Coin et al (76) haben gezeigt, daß von 1156 Wasserproben aus einem Fluß bei Paris 21 % virenpositiv waren. Farrohri (77) hat festgestellt, daß 38-63 % der Wasserproben aus zwei Flüssen in der Schweiz Enteroviren enthalten. Shuval et al (60) wiesen Enteroviren in Wasserproben aus dem Jordan nach. Die Proben wurden bis 25 km vom Abwasserzufluß entfernt entnommen.

Metcalf und Stiles (78) fanden in 27-52 % der Wasserproben aus kontaminierten Flüssen Enteroviren. Lamb (79) isolierte Enteroviren aus 27 von 71 Wasserproben aus dem Illinois. Die Proben wurden

in 1 Meile Entfernung vom Abwasserzufluß entnommen.

Grinstein et al (80) fanden an sieben Meßstellen eines abwasserbelasteten Flusses eine Viruskonzentration um 45 bis 286 PFU pro US-Gallone. Fast alle Proben waren enteroviruspositiv. Primavesi (1) wies in ca 20 % der Flußwasserproben Enteroviren nach. Walter und Rüdiger (81) konnten in 25 % der Proben Enteroviren ermitteln. In 56 % der Themseproben wurden Enteroviren nachgewiesen (82).

Akin (83) nimmt an, daß aus 36 % der gesamten Oberflächenwasserproben Enteroviren isoliert wurden.

Die Persistenz von Enteroviren im Oberflächenwasser ist von verschiedenen Faktoren abhängig, unter anderem von der Temperatur und der organischen Belastung. Untersuchungen ergaben, daß Enteroviren in behandeltem und sauberem Wasser sowie in stark belastetem Wasser eher überleben als in mäßig belastetem Wasser (84). Der Zusatz von Abwasser zum Flußwasser erhöht die Überlebensfähigkeit der Enteroviren (85). Bei niedrigen Temperaturen erreicht die Lebensdauer der Viren mehr als 200 Tage (84).

2.7 Virenvorkommen im Grundwasser.

Grundwasser wird als Wasser mit hoher hygienischer Qualität angesehen. Deshalb dient es mit oder ohne Behandlung für die Wasserversorgung. Die ständige Entnahme von Grundwasser bleibt nicht ohne Folgen: Vielerorts beobachtet man ein Absinken des Grundwasserspiegels. Aus diesem Grund sucht man heute nach Mitteln dieses Absinken durch Zufuhr von Oberflächenwasser- oder von gebrauchtem Wasser zu verhindern. Dieses birgt jedoch das Risiko,

das Grundwasser u.a. mit Viren zu kontaminierten(86,87).

Über das Virusvorkommen im Grundwasser ist bisher sehr wenig bekannt. Einige Epidemien wurden auf mit Viren kontaminiertes Grundwasser zurückgeführt. Die Erreger konnten selten isoliert werden (23). Mack et al (88) haben den ersten Virusnachweis im Grundwasser durchgeführt. Sie isolierten Poliovirus II aus einem 30.5 m tiefen Grundwasserbrunnen, der vom Versickerungsbecken 90.5 m entfernt war. Wellings et al (89) haben ECHO-Virus 22/23 aus einem 30 m von der Abwasserversickerungsstelle entfernten Brunnen isoliert.

Vaughn et al (90) wiesen in einem 3.3 m tiefen Beobachtungsbrunnen Enteroviren nach. Es waren ECHO-Virus und andere undefinierte Viren. Sie haben auch die seitliche Virusbewegung beobachtet. Enteroviren wurden aus einem Brunnen ermittelt, der vom Versickerungsbecken 45.7 m entfernt war, in dem tertiär behandeltes Abwasser versickerte (91).

Schaub und Sorber (92) untersuchten Grundwasser unterhalb von Schnellabwasserinfiltrationsbecken. Sie wiesen Viren in 30 m Tiefe und 182.8 m Entfernung von den Becken nach. Koener und Haws (93) beobachteten primär Abwasserinfiltration durch Sand und fanden Viren in 16.8 m Tiefe und 250 m Entfernung.

Walter und Rüdiger (94) wiesen in 13 % von 62 Grundwasserproben Viren mit einer mittleren MPN von $8 \cdot \text{Cu}^{-1}$ nach. Von 799 Grundwasserproben waren nur 4 virenpositiv (8). Marzouk et al (95) untersuchten 99 Grundwasserproben (20-400 l) in Israel. Davon waren 20 % der Proben virenpositiv. In dem gleichen

Gebiet hat Shuval (60) in zwei Proben Viren ermittelt. Der Brunnen war mit kommunalem Abwasser kontaminiert, auf das Hepatitis Epidemien zurückgeführten wurden.

Die niedrigen Temperaturen im Untergrund begünstigen das Überleben der Viren im Grundwasser. Das Überlebensdauer der Viren im Grundwasser schwankt zwischen 10-113 Tagen (86).

Die vorigen Angaben zeigen deutlich, daß humanpathogene Enteroviren als Folge der Abwasserversickerung ins Grundwasser gelangen können und dort als potentielle Krankheitserreger auftreten.

2.8 Virenvorkommen im Trinkwasser

Trinkwasser wird häufig aus unterschiedlich kontaminiertem Oberflächen oder Grundwasser gewonnen, das vielfach nur durch eine Chlorung vorbehandelt wurde. Die in den Vorbereitungsverfahren benutzten Chlorkonzentrationen reichen jedoch oft nicht aus, um alle im Wasser vorhandenen Viren zu eliminieren (96).

Obwohl über das Auftreten der Enteroviren im Trinkwasser bisher sehr wenig berichtet wurde, führten Autoren infektiöse Hepatitis und andere Enterovirusepidemien auf kontaminiertes Trinkwasser zurück (27,30).

In verschiedenen Staaten konnten Virologen Enteroviren im Trinkwasser nachweisen. In Paris stellten Coin et al (76) während der 60er Jahre fest, daß 18 % von 200 Trinkwasserproben Viren enthielten. Die Viruskonzentration wurde auf eine Viruseinheit pro 300 l geschätzt. In Rumänien isolierten Nestor

und Costin (97) Coxsackieviren aus 2 von 65 Wasserproben. Das Wasser wurde mit Flockung und Sandfiltration behandelt. In Südafrika (98) wurden Enteroviren im Trinkwasser nachgewiesen. In den USA (99) wurde Poliovirus aus Trinkwasserproben isoliert, die freies Restchlor enthielten.

In allen diesen Fällen entsprach die bakteriologische Trinkwasser-qualität den geltenden Anforderungen.

Nach den von Katz und Plotkin (100) durchgeführten Untersuchungen können Enteroviren trotz ihrer niedrigen Konzentration Infektionen beim Menschen verursachen, wenn sie in Kontakt mit empfindlichen Zellen im Körper kommen. Daher schlug Melnick (5) eine Viruseinheit pro 1000 US-Gallonen als Trinkwasserstandard vor.

2.9 Virenbeseitigung durch Sandfiltration.

Bodenfiltration ist einer der wichtigsten Wasserreinigungsprozesse im Naturhaushalt und ist auch heute noch ein sehr wesentlicher Faktor bei der Aufbereitung größerer Wassermengen aus Oberflächenwässern.

Das Aufbringen von Abwasser auf landwirtschaftliche Nutzflächen hat außerdem Vorteile, unter denen Wassererhaltung, Anreicherung des Bodens mit organischem Material, Versorgung der Pflanzen mit Nährstoffen und Schutz des Oberflächenwassers vor Kontamination die wichtigsten sind (101).

Die Viren- und Bakterienbeseitigung durch den Boden oder durch das mechanische Filtrationsverfahren

kann auf die Adsorption zurückgeführt werden. Freie Viren adsorbieren an Sand (101).

Durch Batch- und Säulenversuche stellte man fest, daß die Beseitigung und Mobilität von Viren im Boden von der Fließgeschwindigkeit des Wassers, der Bodenart, dem Virustyp, der Sättigungstufe der Poren, der Kationenkonzentration und der Konzentration organischen Materials beeinflußt werden kann (102).

Das Vorhandensein von Tonmineralien verstärkt die Adsorption von Viren im Boden. Es wird angenommen, daß reine Tonmineralien eine hohe Adsorptionskapazität infolge ihrer Ionenaustauschkapazität und Oberfläche gegenüber Viren zeigen (103).

Rebecca et al (104) untersuchten die Adsorption von Poliovirus I an 34 Mineralien- und Bodensorten. Sie stellten höhere Adsorptionsraten von Viren an Mineralien als an Böden fest. Die besten Böden für die Adsorption waren Magnetite und Hematite, die zum großen Teil aus Eisenoxiden bestehen. Alle benutzten Substanzen adsorbierten mehr als 95 % der Viren.

Niedrige Fließgeschwindigkeiten des perkolierten Wassers begünstigen die Adsorption von Viren an Sand, weil sie die Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes zwischen Viren und Sandpartikeln ermöglichen (105).

Vaughn et al (106) stellten fest, daß hohe Infiltrationsraten (75 bis 100 cm/h) die Mobilisierung von Poliovirus I ins Grundwasser zur Folge haben. Gemäßigte Fließgeschwindigkeiten (6 cm/h) verbesserten die Beseitigung von Viren im Sand. Langsame Fließge-

schwindigkeiten (0.5 bis 1 cm/h) erzielten die beste Virusbeseitigung durch den Sand.

Bei Infiltrationsraten von 0.6 m/Tag bis zu 1.2 m/Tag ermittelten Lance und Gerba (107) einen 1 % igen Virusdurchbruch. Bei Fließgeschwindigkeiten bis zu 12 m/Tag wurden 99 % der Viren durch den Sand beseitigt. Bei schnellen Infiltrationsraten unterhalb eines Versickerungsbeckens für Abwasser wurden Enteroviren noch in einer Tiefe von 180 m nachgewiesen (108).

Durch ihre Proteinhülle haben Enteroviren amphoteren Charakter. Bei alkalischem pH-Wert verhalten sich die Viren und Sandpartikel wie Anionen, deswegen weisen sie einander ab. Die Adsorption von T₁-Phagen wurde bei pH 8 bis zu 40 % verringert (109). Gerba und Goyal (110) beobachteten die gleiche Erscheinung bei alkalischen pH-Werten. In sauren pH-Bereichen dagegen wird die gesamte negative Ladung auf der Virushülle positiv, weil ihr isoelektrischer Punkt im niedrigen pH-Bereich liegt, so daß die Viren an die negativ geladenen Sandpartikel angelagert werden können (110,111).

Die Adsorption von Viren an Sand wird von der Konzentration und der Wertigkeit der im Wasser vorhandenen Kationen wesentlich beeinflusst (90). Die Adsorption wird durch Kationenbrückenbildung zwischen dem Viruspartikel und Bodenpartikeln verstärkt (104). Bei Vorhandensein einer geeigneten Kationenkonzentration werden die Viren besonders wirksam zurückgehalten (112). Die Kationen verringern das abstoßende elektrostatische Potential auf Sand- und Viruspartikel, dadurch erhöhen sie die Möglichkeit der Adsorption von Viren (113).

Die Versickerung des Regenwasser in den Boden verringert die Ionenstärke des Bodens. Deswegen ist zu erwarten, daß das Regenwasser die Mobilität der Viren im Boden fördert (111,114). In Laborversuchen wurde destilliertes Wasser als Stellvertretend für Regenwasser verwendet und bei dessen Anwendung in Sandsäulen die Mobilität der Viren in der Säule festgestellt wurde (115).

Organische Substanzen stören die Virenadsorption an Sand, weil sie mit ihnen um Adsorptionstellen an Sandpartikeln konkurrieren (96). In diesem Zusammenhang ist wichtig, den Einfluß der im Abwasser vorhandenen organischen Substanzen festzustellen. Lo et al (116) fanden, daß organisches Material im Wasser die Adsorption der Viren stören kann. Außerdem verursacht es die Entfernung adsorbierter Viren vom Sand. In anderen Untersuchungen ergab das Vorhandensein von organischen Substanzen oder Huminsäure keinen Einfluß auf die Adsorption von Viren (117). Beim Fluten der Sandsäule 27 Tage lang mit Abwasser wurde keine Sättigung der ersten Fraktionen erreicht und die Virenmobilität wurde nicht beeinflusst (115).

Die Bodenfeuchtigkeit spielt eine wesentliche Rolle bei der Inaktivierung und Zurückhaltung der Enteroviren im Boden (115, 119,120).

Im gleichen Zusammenhang haben Carlson et al (103) gezeigt, daß durch 1 mg Albumin/l die Adsorption von Viren um 40 % verringert wurde und durch 10 ml/l Abwasser um 12-14 %.

Untersuchungen ergaben, daß die Virusadsorption an Boden virusspezifisch ist (117,110). Goyal und Gerba (110) fanden bei ihren Untersuchungen

mit verschiedenen Enteroviren und Bakteriophagen, daß kein Virus oder Phage für die Adsorptionvorgänge der Enteroviren als Modell angenommen werden kann.

Landry et al (118) fanden unterschiedliches Adsorptions-Elutionsverhalten innerhalb eines Virustyps. Deswegen kamen sie zu dem Schluß, daß Poliovirus Stamm Lsc kein repräsentatives Modell für die Adsorption der Enteroviren ist.

3. Ziel der Arbeit.

Grundwasser ist ein sehr wichtiger Bodenschatz, der vor Kontamination geschützt werden muß. Das Vorkommen von humanpathogenen Viren im Grundwasser hängt von zwei Hauptfaktoren ab:

1. die Überlebensfähigkeit der verschiedenen Viren im Boden und im Grundwasser,
2. das Verzögerungsvermögen des Bodens bei der Zurückhaltung der Viren durch seine Adsorptionsvermögen, bis eine Inaktivierung stattfindet.

Für die Abschätzung der mit der Anreicherung des Grundwassers verbundenen gesundheitlichen Gefährdung und den Schutz des Grundwasser vor virologischer Verschmutzung muß der Zusammenhang zwischen beiden Punkten festgestellt werden.

Diese Arbeit sollte die folgenden Fragen klären:

1. Wie lange können die verschiedenen Viren (Polio I, Cox A9, Cox B1, Echo 7, Rota SA-11) unter ähnlichen Bedingungen wie sie im Untergrund

vorkommen infektiösfähig bleiben ?

2. In welchem Umfang können die verschiedenen Faktoren (Kationen, Huminsäure, pH-Wert, Sandsorte, Wasserqualität, Wasservolumina, Fließgeschwindigkeit etc.) die Eindringstrecke der Viren in der Säule beeinflussen, und wie tief die können Viren in einer bestimmten Zeit unter diesen Bedingungen in die Säule eindringen?

Zusätzlich wollten wir die Eliminierung von Viren aus dem Wasser nach einer Wanderungszeit von 50 Tagen im Untergrund abschätzen. (Eine Periode von 50 Tagen wird in der Schutzverordnung für Grundwasser, das als Wasserversorgungs quelle verwendet wird, vorgeschrieben.)

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Wasserarten.

Für die Versuche wurden vier verschiedene Wasserarten mit unterschiedlicher organischen und anorganischen Zusammensetzung verwendet, deren Beschaffenheit den Transport der Viren ins Grundwasser bedeutsam sein kann.

4.1.1 Grundwasser.

Es handelt sich um Grundwasser aus einer Quelle, aus der ein Teil der Wasserversorgung in Berlin gewährleistet wird. Grundwasser dient als Beispiel für eine Wasserart mit hohem Kationengehalt (Tabelle 2). Die Proben wurden aus Brunnen neben dem Wannsee (Berlin) genommen. Bis zu ihrer Verarbeitung wurden sie im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt.

4.1.2 Biologisch behandeltes Abwasser.

Das biologisch behandelte Abwasser hat einen hohen Anteil an organischen Stoffen. Die Proben wurden aus dem Abwasser-Abfluß der Kläranlage in Ruhleben (Berlin) entnommen, in der das Abwasser mit dem Belebtschlammverfahren behandelt wird. Die Analysenwerte stammen aus dem chemischen Laboratorium der Kläranlage (Tabelle 3).

Tabelle 2. Die Zusammensetzung des Grungwassers.

Entnahmedatum 1982

<u>Parameter</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Parameter</u>	<u>Konzentration</u>
Temperatur	11.4 °C	K ⁺	2.6 mg/ml
pH-Wert	7.3	Fe gesamt	0.95 "
O ₂	0.3 mg/ml	Mn "	0.26 "
CO ₂ Frei	23.0 "	NH ₄ ⁺	1.26 "
Gesamthärte	13.6 °d	NO ₂ ⁻	0.0 "
Karbonat "	11.5 "	Cl ⁻	44.0 "
Ca ⁺²	77.0 mg/ml	Leitfähig	490.0 us/cm
Mg ⁺²	6.4 "	keit	
Na ⁺	40.2 "	org.C	3.4 mg/ml

Tabbelle 3. Die Zusammensetzung des biologisch behandelten Abwassers.

<u>Parameter</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Parameter</u>	<u>Konzentration</u>
pH-Wert	7.2	Ni	0.03 mg/ml
BSB ₅	6.0 mg/ml	Fe	0.15 "
org.C	14.0 "	Cd	0.005 "
TS	7.5 "	Pb	0.045 "
NO ₂ ⁻	0.3 "	SO ₄ ⁻	165.0 "
org.N	2.5 "	PO ₄ ⁻	30.0 "
NH ₄ ⁺	11.0 "	CaO	14.0 °d
NO ₃	2.5 "	MgO	2.5 "
Cl ⁻	140.0 "	Cu	0.015 mg/ml
Detergent	0.35"	Cr	0.01 "

4.1.3 Weitergehend behandeltes Abwasser.

Ein Teil des biologisch behandelten Abwassers wird in einer Pilotanlage neben der Kläranlage behandelt, um die Wasserqualität zu verbessern. Das in der Pilotanlage behandelte Wasser wird zur Anreicherung des Grundwassers benutzt. Tabelle 4 zeigt die Konzenration einiger Wasserinhaltsstoffe.

Tabelle 4. Die Zusammensetzung des weitergehend behandelten Abwassers.

Datum 16.10.83

<u>Parameter</u>	<u>Konzentration (mg/ml)</u>
pH	6.7
NH ₄ ⁺	25.6
NO ₂	0.07
NO ₃	29.0
PO ₄	1.9
Cl ⁻	274.0
org.C	7.9
UV-Extinktion	14.8

4.1.4 Destilliertes Wasser.

Das destillierte Wasser, das keine organischen oder anorganischen Bestandteile enthält, wurde als Ersatz für Regenwasser verwendet.

4.2 Zellen.

4.2.1. BGM - Zellen.

Die Zellen stammen aus Nierengewebe einer afrikanischen Affenart, die in MEM mit Eagle`Salzen kultiviert wurden. Zum Medium wurden 10 % FKS (Foetales Kälber Serum), 1 % Glutamin und 1 % Antibiotika (100 Einheiten Penicillin und 100 ug Streptomycin) zugegeben.

Die Zellen wurden routinemäßig als Gewebekulturen in 75 cm² Rouxflaschen kultiviert. Die Gewebekultur wurde mit ca. 10 ml eines Gemisches von 0.1 % Trypsin und 0.05 % Ethylenediamintetraessigsäure abgelöst. Ein Teil der Zellen wurde für die Nachweisverfahren benutzt und der Rest für die weitere Züchtung der Zellen.

4.2.2. MA-104 - Zellen.

Die Zellen stammen aus Rhesusaffennieren. Sie wurden von dem Deutschen Referenz-Zentrum für Enteroviren an uns geliefert. Die MA-104-Zellen wurden genau wie die BGM Zellen behandelt.

4.3 Testviren und Virenzüchtung.

Die in unseren Versuchen verwendeten Viren sind Poliovirus I LSC 2ab, Coxsackievirus A9 Bozek, Coxsackievirus B1 Conn-5, Echovirus 7 Wallece und Rota SA-11-Virus. Die ersten vier Virusarten haben wir vom Deutschen Referenz Zentrum für Enteroviren in Münster erhalten.

Das Rota SA-11-Virus wurde an uns von ATCC, Rockville, USA bezogen.

4.3.1 Züchtung der Viren in BGM - Zellen.

Für die Adsorptionsversuche war es wichtig, eine Virus-Suspension ohne Serum zu erhalten, weil Serum die Adsorption am Sand beeinflussen kann. Deswegen wurden besondere Verfahren für die Virenzüchtung verwendet.

1. Züchtung der Zellen in Rouxflaschen, bis ein Monolayer zuge wachsen ist. (3-5 Tage)
2. Das Wachstumsmedium wurde aus der Flasche gegossen.
3. In die Flasche wurden 1-2 ml Virus-Suspension pipettiert.
4. Die Kulturen wurden ca. 30-60 Min. bei 37°C bebrütet.
5. Danach wurden 100 ml MEM + 2 % FKS, 1 % Antibiotika zugegeben, die Kulturen 12-15 Stunden bebrütet. Es wurde darauf geachtet, daß die Zellen weiter

bearbeitet wurden, bevor sie durch den auftretenden CPE* von der Glaswandung der Flasche abgelöst wurden.

6. Die Kulturen wurden zweimal mit PBS gewaschen, danach wurden darauf 20 ml PBS pipettiert.
7. Die Kulturen wurden dreimal bei -20°C eingefroren und aufgetaut.
8. Die Suspension wurde mit Ultraschall 100 khz, 5 Min. behandelt.
9. Es wurde 10 Min. bei 5000 rpm abzentrifugiert.
10. Der Überstand wurde bei -20°C aufbewahrt.
Durch dieses Verfahren wurde regelmäßig ein Titer von 10^7 - 10^8 PFU/ml erreicht.

4.3.2 Züchtung des Rotavirus SA-11 in MA-104-Zellen.

Da das FKS das Wachstum des SA-11 verhindert (121), wurden die Zellkulturen vor der Impfung des SA-11 dreimal mit PBS gewaschen.

Das Wachstum des Rota SA-11-Virus ist von der Trypsin-Konzentration im Medium abhängig (122). Deswegen wurde Trypsin zu einer Endkonzentration 3 $\mu\text{g/ml}$ zum serumfreien MEM zugegeben. Die weiteren Züchtungsverfahren sind wie unter 3.1.

* Cytopathogenic Effect

4.4. Virusnachweisverfahren.

Für die Bestimmung der Viren in den Versuchen wurde die Plaque-Assay-Methode verwendet.

4.4.1 Plaque-Assay mit BGM- Zellen (8).

1. Die BGM-Zellen wurden in Petrischalen für Gewebekulturen in MEM+ 10 % FKS, 1 % Antibiotika kultiviert.
2. Nach dem Zuwachsen der Gewebekulturen (3-5 Tage) wurde das Medium mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt.
3. 0.3 ml Virus-Suspension wurden auf die Kulturen geimpft. Es ist wichtig die Schalen zu drehen, um gleiche Virusverteilung auf den Kulturen zu erreichen.
4. Die Kulturen wurden 30-60 Min. bei 37°C bebrütet.
5. Danach wurde mit 50 % Agar und 50 % MEM*2 (Doppelkonzentration) in 5 ml-Portionen überschichtet. Die Kulturen wurden 2-3 Tage bei 37°C bebrütet.
6. Um die Plaques zu zählen, wurden die Kulturen mit 50% Agar und 50 % Neutralrot-Lösung 1:6000 überschichtet.

4.4.2 Plaque-Assay des Rota SA-11-Virus in MA-104 Zellen (123).

Die MA-104 Zellen wurden wie BGM-Zellen in Petrischalen für Gewebekulturen kultiviert.

1. Die Zellen wurden mit ca. 5 ml PBS dreimal gewaschen.
2. 0.3 ml Rotavirusproben wurden auf die Kulturen verteilt.
3. Die Kulturen wurden bei 37°C für ca. 60 min. bebrütet.
4. Trypsin ist wichtig für das Rotaviruswachstum. Da die Wirkung des Trypsins von einer Konzentration zur anderen verschieden sein kann, wurde eine Titration mit verschiedenen Trypsinkonzentrationen durchgeführt, um eine optimale Konzentration für den Plaque-Assay zu finden.

0-25 ug/ml Trypsinkonzentrationen wurden benutzt. Aus dem Versuch ergab sich, daß bei 10-15 ug/ml eine optimale Wirkung beobachtet wurde. Danach wurde die kombinierte Wirkung von 15 ug/ml Trypsin mit verschiedenen DAETA-Dextran-Konzentrationen untersucht. (Tabelle 4).

Tabelle 5. Einfluß von DAETA-Dextan und Trypsin auf die Zahl und Größe von Rota-SA-11-Plaques.

<u>Behandlung</u>	<u>PFU/ml</u>	<u>Zellschaden durch die Behandlung</u>	<u>Plaquegröße</u>
Kontrolle (-)	---	---	---
15 ug/ml Tryp	$2.6 \cdot 10^7$	---	1-2 mm
" + 5ug/ml D	"	---	1-2 mm
" + 10ug/ml D	"	---	1-3 mm
" + 20ug/ml D	$2.7 \cdot 10^7$	---	1-3 mm
" + 30ug/ml D	$3.2 \cdot 10^7$	---	1-4 mm
" + 50ug/ml D	$3.4 \cdot 10^7$	---	1-4 mm
" + 100ug/ml D	$2.5 \cdot 10^7$	+	1 mm

Aus der Tabelle ergab sich, daß die optimale Kombination von Trypsin und DAETA-Dextran 15 ug/ml und 50 ug/ml ist. Die weiteren Verfahren sind die gleichen wie unter 4.1.

4.5. Batchversuche.

Die Adsorption von ausgewählten Testorganismen an verschiedene Sandfraktionen wurde zuerst in Batchversuchen geprüft. Je nach Versuchsansatz wurden 0,1-1,0 g der sterilisierten Sandfraktionen mit 5 ml sterilem dest. Wasser mit oder ohne Puffer- und Ionenzusatz in einem Falcon-Röhrchen vermischt. Die Falcon-Röhrchen bestehen aus Polystyrol, haben einen Durchmesser von 2,7 cm und eine Länge von 10 cm. Die Oberfläche der Röhrchen war im Verhältnis zur angebotenen Sandoberfläche klein. Die Virusadsorption an die Wände des Röhrchens wurde bei jedem Versuch durch eine Kontrollprobe ohne Sandzusatz geprüft.

Nach der Beimpfung der Proben mit den Viren zu einer Endkonzentration von ca. 10^6 - 10^7 PFU/ml wurden sie 30 min lang auf einer horizontalen Schüttelmaschine geschüttelt. Anschließend wurden sie 30 min lang bei 5000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Bestimmung des Virustiters bei -20°C aufbewahrt. Den prozentualen Anteil der adsorbierten Viren A (%), errechneten wir nach folgender Gleichung:

$$A (\%) = \frac{T - S}{T} * 100$$

wobei T = Anzahl frei suspendierter Viren in den sandfreien Kontrollröhrchen.

S = Anzahl frei suspendierter Viren in den mit Sand versehenen Röhrchen.

4.6 Säulenversuche.

Zur Untersuchung des Transportverhaltens von Viren wurden Säulenversuche angestellt. Dazu dienten Glassäulen mit einem Innendurchmesser von 4,6 cm und einer Länge von 20 cm, die mit Sand gefüllt wurden. Da die Batchversuche keinen großen Unterschied zwischen den drei Sandfraktionen hinsichtlich ihrer Adsorptionseffektivität zeigten, wurde bei der Füllung der Säulen das ungesiebt gelieferte Sediment aus dem Grundwasserleiter des Segeberger Forstes verwendet. Aus technischen Gründen mußten allerdings die Korngrößen größer als 1 mm verworfen werden. Die Säulen wurden mit besonderer Sorgfalt gefüllt, um ein luftblasenfreies Transportmedium zu erzielen. Dafür wurde die eingewogene Menge an Sand zuerst mit dest. Wasser unter ständigem Rühren zentimeterweise mit Hilfe eines Löffels zugegeben. Am Zuflußrohr der Säule wurde mit Hilfe eines Schlauches der hydrostatische Druck des zufließenden Wassers soweit reguliert, daß der Sand gerade mit Wasser gesättigt war. Mit Hilfe einer dünnen Pipette wurden eventuell vorhandene Luftblasen entfernt. Durch diese stufenweise Füllung der Säule wurden die kolloidalen Partikel nicht aufgeschwemmt, und die Homogenität der jeweils eingebrachten Sandfraktionen blieb dabei erhalten. Nach der Füllung der Säule wurde darauf geachtet, daß die Sandoberfläche immer unter dem Wasserspiegel lag, so daß ein Lufteintritt in die Porenräume des Sandes verhindert wurde.

Die Fließgeschwindigkeit des Wasser wurde durch die Höhenänderungen in dem System (s. Abb. 1) eingestellt, wobei der jeweils eingestellte Durchfluß mit Hilfe eines Tropfenzählers bzw. Fraktions-sammlers konstant gehalten werden konnte.

Die Nutzporosität des in die Säule eingebrachten Filtermediums wurde mit Hilfe einer Uranin A-Lösung experimentell bestimmt. Die Farbstofflösung wurde vorsichtig auf die Sandoberfläche aufgeschichtet. Anschließend wurde die Säule an ein Reservoir angeschlossen, und es wurde die Menge Flüssigkeit ermittelt, die aus der Säule floß, bevor die Farbstofffront das Säulenende erreichte. Die Durchflußmenge (50 ml/h) wurde gering gewählt, um Wandeffekte klein zu halten und um die Diffusionsstrecke des Farbstoffes in der gleichen Größenordnung zu halten wie die vertikal zurückgelegte Strecke.

Die Farbstofffront erschien nach einem Volumen von 87,0 ml (Abb.4). Stellt man dieses Volumen dem Volumen der Sedimentsäule gegenüber, so kommt man auf eine Nutzporosität von 40,3 %.

Bei unseren Untersuchungen haben wir mit Abstandsgeschwindigkeiten von ca. 0,5, 1, 2 und 5 m/d gearbeitet. Dementsprechend ergeben sich die in der Tabelle 6 angegebenen Filtergeschwindigkeiten und Q-Werte (Tabelle 6).

Tabelle 6: Einige Transportparameter in Abhängigkeit der Abstandsgeschwindigkeit.

Abstandgeschw. Va	Filtergeschw.	Q-Werte	Tropf/min	l Tr.	
<u>m/d</u>	<u>cm/min</u>	<u>Vf cm/min</u>	<u>cm³/min</u>	<u>in sec</u>	
0.52	0.0358	0.0144	0.240	3.76	16"
1.03	0.0717	0.0288	0.48	7.5	8"
2.06	0.1434	0.0576	0.96	15.0	4"
4.13	0.2869	0.1152	1.98	30.0	2"

Das Filtrat wurde mit Hilfe eines LKB-Fraktionssammlers fraktioniert. Die Fraktionen von 20-30 ml wurden auf ihren Virustiter hin untersucht. Nach Beendigung der Filtration wurde der Säulinhalt mit Hilfe eines Gummiballs langsam aus der Säule ausgepreßt und mit einem Messer in 1 cm dicke Fraktionen aufgeschnitten. Die Sandproben wurden gleich mit 30 ml einer 0,8 %igen Nutrient Broth Lösung bei pH 9, 30 Minuten lang durch Schütteln auf einer horizontalen Schüttelmaschine eluiert. Die frei suspendierten Viren wurden dann durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 5000 g vom Sand getrennt und bis zur Titerbestimmung bei - 20°C aufbewahrt.

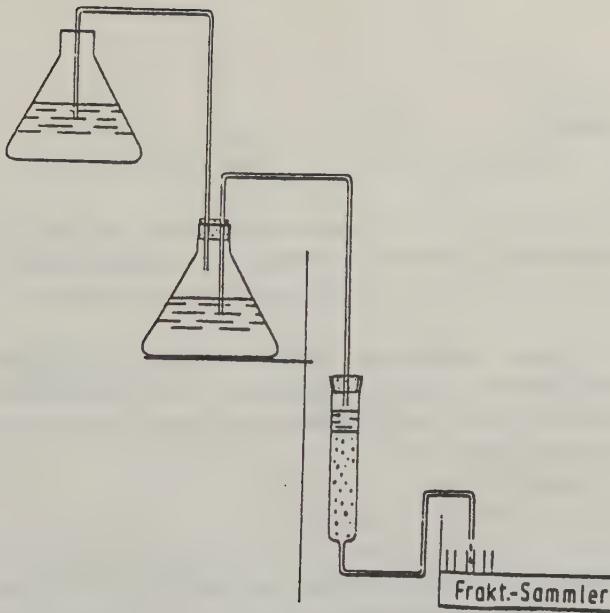


Abbildung 1 : Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für die Säulenversuche. Das Wasser floß vom oberen offenen Erlenmeyerkolben in das untere geschlossene Gefäß, das als Mariott'sche Flasche diente. Der hydrostatische Druck, und somit die Wassergeschwindigkeit, wurde eingeschaltet durch Änderungen der Höhe der Mariott'schen Flasche gegenüber dem Ausgang der Säule. Die Zeichnung ist nicht maßstabsgerechnet.

4.7 Material.

Sand: Die in den Versuchen verwendeten mittel- und ungesiebten Sandarten stammen aus einem Aquifer in dem Segeberger Forst in Norddeutschland (124).

MEM: Minimum Essential Medium (Eagle), Pulver Gewebezucht-Medium mit Earle's, L- Glutamine, non Essential amino acids. MEM wurde mit 2 g NaHCO_3 und 3.6 g Hepes angesetzt.

Gibco Europe CT. No.072-1500.

FKS: Foetales Kälber Serum, wurde in 2 % bzw 10 % im Medium benutzt.

Gibco Europe CT: No. 011-6290. Batch No. 05F1232S.

Antibiotika: Eine Lösung von 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 ug/ml Streptomycin wurde jedes Mal angesetzt und bei -20°C aufbewahrt.

Penicillin wurde von der Hoechst AG Frankfurt am Main unter Reg.-Nr.P277-3 geliefert. Streptomycin Ch.-B 829623 von Heyl. Chem.Pharm.Fabrik, Berlin.

Trypsin-Versen: Eine Lösung, die in unserem Labor von 0.1 % Trypsin und 0.05 % Ethylendinitrilotetraessigsäure angesetzt wurde. Die Lösung wird benutzt, um die Zellen vom Glas der Flasche abzulösen.

Wir haben Trypsin 1:250 aus den Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA benutzt . CT-0152-15-9.

Ethylendinitrilotetraessigsäure P.B 1968 , Cod.
Franc.1965 Ph. Nord. 1963 USPXV III E.Merck, Darmstadt.

Trypsin: Ein wichtiges Element für das Wachstum
des Rota SA-11-Virus, wurde in 3-15 ug/ml Endkonzent-
ration benutzt.

DEATE -Dextran: Ein wichtiges Element für das
Wachstum des Rota SA-11-Virus, wurde in 50 ug/ml
Endkonzentration verwendet.

Cod.No. 17-0350-01 Lot No. 7860 .

Nutrient Broth: Eine Lösung, die für die Elution
der Viren vom Sand benutzt wurde. Nutrient Broth
wurde in einer Konzentration von 1 % und pH-Wert 9
verwendet.

Bacto Nutrient Broth Dehydrated 0003-01-6-- Difco
Laboratories Detroit, Michigan, USA .

Agar: Nobel Agar wurde als 50 % des Overlay
verwendet, um die Bewegung der Viren zu begrenzen.
Die Viren vermehren sich an festen Stellen. Der
CPE erscheint im Gewebe als Loch, das Plaque genannt
wird.

Agar Nobel 0142-01 Cont 685752 Difco Laboratories
Detroit, Michigan, USA .

Neutralrot: Das Neutralrot diente als Farbstoff
für die Gewebekulturen. Es färbt die Zellen rot,
so daß die Plaques sichtbar werden.

Art .1369 C.I 50040 S.Nr 946 E. Merck, Darmstadt.

5. VERSUCHE UND ERGEBNISSE

5.1 Überlebensdauer von Enteroviren im Grundwasser.

Der Inaktivierungsverlauf von vier Enteroviren (Polio I, Cox A9, Cox B1, Echo 7) und einem Rotavirus (SA-11) wurde unter den gleichen Bedingungen wie sie im Untergrund herrschen beobachtet. Die Versuche wurden in einem Kühlraum bei 10°C durchgeführt. Dies entspricht der durchschnittlichen Temperatur des Grundwassers in Mitteleuropa.

Der Anfangstiter der getesteten Viren schwankte zwischen 10^5 - 10^8 PFU/ml. Wie in Abbildung (2) zu sehen ist, blieben alle getesteten Viren im Grundwasser lange Zeit infektiösfähig. Nach ca. 300 Tagen nahm der Titer der verschiedenen Viren um ein log bis zwei log ab. Der Titer der eingegebenen Cox.B1- und Cox.A9-Viren wurde um zwei log gesenkt, während der Titer von Polio 1- und Echo 7-Viren um ein log verringert wurde.

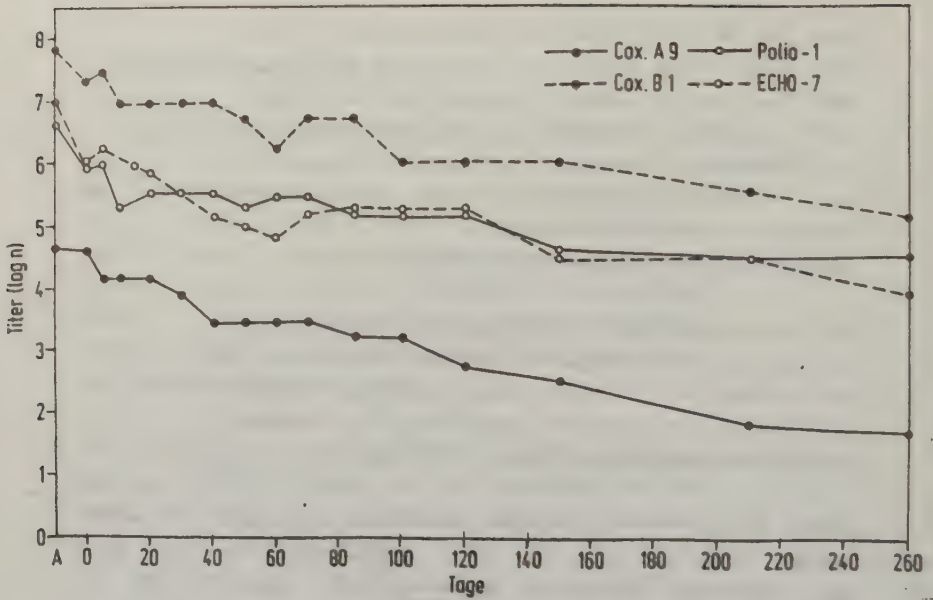
In Abbildung (3) wurde der Inaktivierungsverlauf des Rota SA-11- Virus dargestellt. Im Grundwasser verlief die Inaktivierung von Rota SA-11-Viren genauso langsam wie die der anderen Viren, so daß nach 100 Tagen der Titer der eingegebenen Rotaviren um zwei log abgenommen hatte. Im mit Grundwasser überschichteten Sand ergab sich kein großer Unterschied und der Inaktivierungsverlauf von Rotaviren war ähnlich wie im Grundwasser, d.h. der Titer der eingegebenen Viren wurde um zwei log gesenkt.

Zusätzlich wurde die Inaktivierung von Rota-SA-11-Virus im mit Grundwasser gesättigten Sand getestet. Unter diesen Bedingungen verlief die Inaktivierung von

Rotaviren am schnellsten, so daß nach ca. 50 Tagen die Viren völlig inaktiviert wurden. Für die Elution der Viren vom Sand wurde 1 %-ige Nutrient-Broth-Lösung, pH-9 verwendet. Um sicher zu sein, daß keine Viren in der Suspension vorhanden sind, haben wir Sandpartikel auf Gewebekulturen geimpft. Diese Methode wurde von Lefler et al (112) beschrieben. Dadurch haben wir die gleichen Ergebnisse erzielt.

Man kann die getesteten Viren nach ihrem Inaktivierungsverlauf in zwei Gruppen einteilen. Poliovirus I und Echovirus 7, die langsam inaktiviert wurden und Cox B1, Cox A9 und Rota-SA-11, die schneller als die erstgenannten Viren inaktiviert wurden.

Obwohl 90 bis 99 % der eingegebenen Viren inaktiviert wurden, sind 10^2 bis 10^6 PFU/ml aktive Viren in der Suspension verblieben. Außer von den Umweltfaktoren hängt die Überlebensdauer der Viren im Grundwasser von ihrem Anfangstiter wesentlich ab.



**Abbildung 2 : Inaktivierung von Enteroviren
in unbehandeltem Grundwasser.**

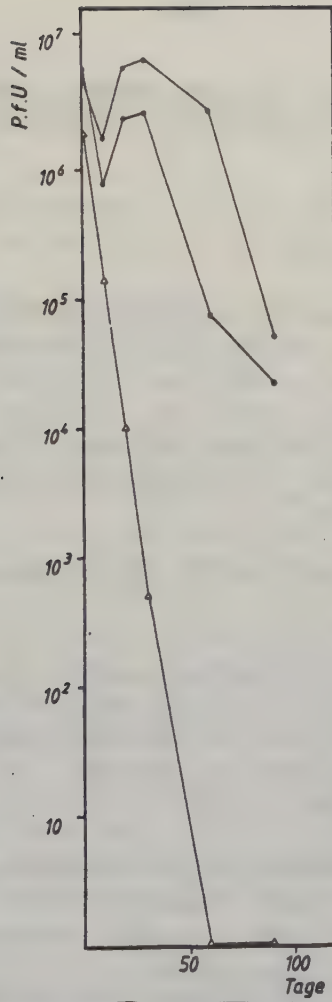


Abbildung 3 : Inaktivierung von Rota SA-11-Viren

- : Im Grundwasser.
- : Im mit Grundwasser übersättigten Sand.
- Δ: Im gesättigten Sand.

5.2 Einfluß von Salz und Temperaturbehandlung auf das Zurückhalten der Viren im Sand.

5.2.1 Einfluß des Salzes

Es ist bekannt, daß das Vorhandensein von Kationen in der Umgebung eine wichtige Rolle bei der Adsorption der Viren an Sand spielen kann. Diese Versuche wurden durchgeführt, um die Frage zu beantworten, ob der Zusatz von Salz einen zeitlichen Unterschied in der Verzögerung der Viren gegenüber dem strömenden Wasser verursachen kann.

In dieser Versuchsreihe wurden die Säulen mit Mittelsand gefüllt.

Durch die Markierung der Säulenoberfläche mit Phenolrot kann die Verzögerung der Viren in der Säule festgestellt werden. Die Retention ist als zeitlicher Unterschied zwischen dem Auftreten des Farbstoffes und der Viren im Eluat erkennbar.

In Abbildung 4 wurden die Ergebnisse des Virentransports mit destilliertem Wasser dargestellt. 5.7 % der eingegebenen Viren wurden im Eluat nachgewiesen. Die Verzögerungszeit betrug 6 Stunden.

Abbildung 5 zeigt den Transport der Viren durch die Säule mit destilliertem Wasser, das 2 mM NaCl enthält. Es ergab sich kein zeitlicher Unterschied beim Zurückhalten der Viren in beiden Versuchen. Aber bei der Anwendung von 2 mM NaCl wurden nur 0.9 % der gesamten Viren im Eluat nachgewiesen.

Die ähnliche Verzögerungszeit in beiden Versuchen

kann auf zwei Faktoren zurückgeführt werden :

1. Eine kleine Virenmenge kann die Säule wegen des Wandeffektes passieren.
2. Während des Versuches findet kein völliges Adsorptionsgleichgewicht statt. Deswegen können immer Viren im Eluat vorkommen.

95-99 % der Viren verblieben nach der Elution in der Säule. Es wurde versucht die adsorbierenden Viren mit destilliertem Wasser zu waschen. Durch dieses Verfahren wurde die Säule nicht völlig von Viren befreit. Die gleiche Erscheinung wurde bei Lefler et al (112) beschrieben, die festgestellt haben, daß nach zehnmal Waschen mit destilliertem Wasser viele Viren in der Säule verblieben sind. Die in der Säule adsorbierenden Viren stören bei der Verwendung der Säule in weiteren Versuchen.

Deshalb wurde beschlossen, die Viren durch Temperaturbehandlung zu inaktivieren. Die Säule wurde mit 2 Liter auf 60°C erwärmtem destilliertem Wasser gewaschen. Die Inaktivierung der Viren war 100-prozentig.

Weil die Temperaturbehandlung die Sandbeschaffenheit ändern kann, wurde der Einfluß der Temperatur auf das Zurückhalten der Viren in der Sandsäule untersucht.

5.2.2 Einfluß der Temperaturbehandlung.

Zwei Säulen wurden mit 12 cm Mittelsand gefüllt. Die eine wurde mit 2 Liter 20°C destilliertem Wasser gewaschen, die andere mit 2 Liter 60°C warmem

destilliertem Wasser. Danach wurde der Säulensand mit ca. 4 Liter destilliertem Wasser gewaschen. 2 ml 10^7 PFU Poliovirus I wurden auf die Säulenoberfläche pipettiert. Die Säule wurde an ein mit destilliertem Wasser gefülltes Reservoir angeschlossen. Die aus der Säule eluierten Viren wurden ermittelt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 zusammengefaßt. Im Eluat der mit 20°C Wasser gewaschenen Säule wurden $2.4 \cdot 10^4$ PFU Viren ermittelt. Aus der mit 60°C warmem destilliertem Wasser behandelten Säule wurden $1.6 \cdot 10^4$ PFU der Viren im Eluat nachgewiesen. Durch die Temperaturbehandlung passierten die Säule zweimal weniger Viren als die Kontrolle.

Die Temperaturbehandlung kann die an Sand adsorbierende organische Stoffe auswaschen. Dadurch werden zusätzliche Adsorptionsstellen an den Sandpartikeln die Viren ausgesetzt. Infolge der Temperaturbehandlung ändert sich wahrscheinlich die Ladung an Sandpartikeln, so daß sich mehr Viren anlagern können.

Als nächster Schritt wurde der kombinierte Einfluß der Temperatur und des Salzes auf die Adsorption der Viren an Sand untersucht.

Der Versuch wurde unter 2.1 beschrieben. Zusätzlich wurden 2 mM NaCl ins destillierte Wasser zugegeben (Abbildung 7). Im Eluat der mit 20°C Wasser behandelten Säule wurden $6 \cdot 10^4$ PFU ermittelt. Während im Eluat der mit 60°C warmen Wasser behandelten Säule nur $2 \cdot 10^4$ PFU nachweisbar waren. D.h. durch die Wirkung von Temperatur und Salz passierten die Säule Dreimal weniger Viren.

5.2.3 Einfluß der Temperatur auf die Adsorption in Batch.

Um sicher zu sein, daß die Temperaturbehandlung die Adsorption der Viren an Sand verstärkt, wurde der Einfluß der Temperatur auf die Adsorption der Viren am Sand in den Batchverfahren untersucht.

Der Versuch wurde mit 0.1 g Sand und 10^5 PFU Poliovirus-I bei verschiedenen Temperaturen (20, 50, 60, 80, 100°C) durchgeführt. In einem Röhrchen wurden 0.1 g Mittelsand und 0.5 ml destilliertes Wasser gemischt und in verschiedene Wasserbäder für ca. 60 Minuten gestellt. Danach wurde das Gemisch abgekühlt. 10^5 PFU/ml Polio I wurden hinzugegeben. Nachdem Schütteln des Gemisches für ca. 30 Minuten, wurden die Viren vom Sand durch Zentrifugation getrennt und das Virustiter im Überstand.

Die Adsorption nahm bei 60°C um ein log zu. Bei höheren Temperaturen wurde der gleiche Effekt festgestellt (Abbildung 8).

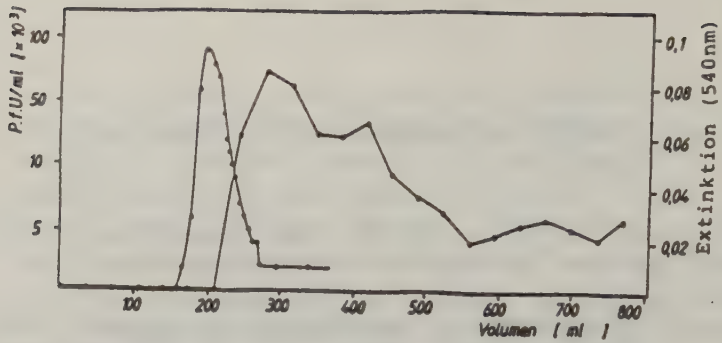


Abbildung 4 : Die Elution von Polioviren I mit Hilfe destillierten Wassers. ●—● Tracer, ○—○ Viren.

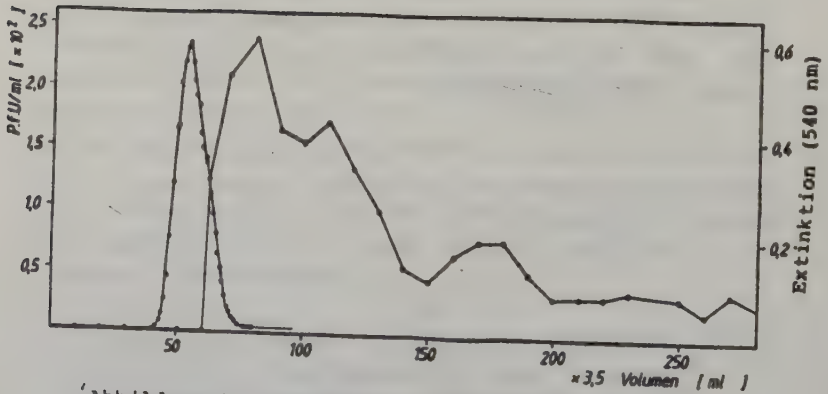


Abbildung 5 : Der Einfluß von 2mM NaCl auf die Zurückhaltung von Polioviren I in der Säule. ●—● Tracer, ○—○ Viren.

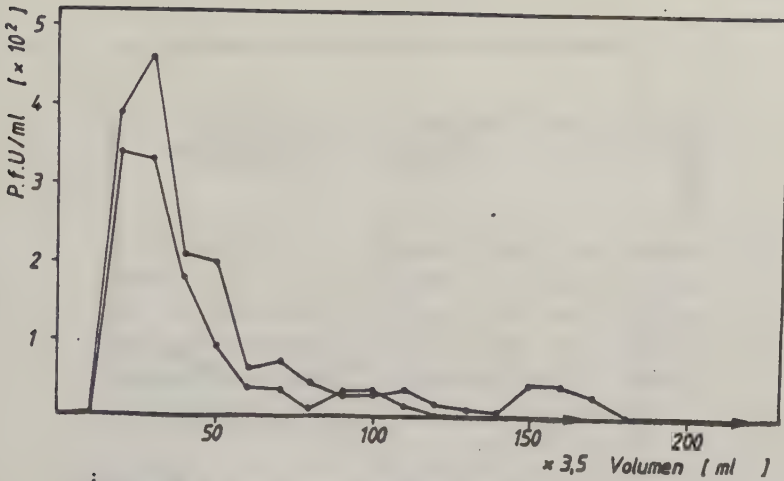


Abbildung 6 : Der Einfluß der Temperatur-Behandlung auf die Zurückhaltung von Polioviren I in der Säule. O--O ohne Behandlung, ●--● mit Behandlung.

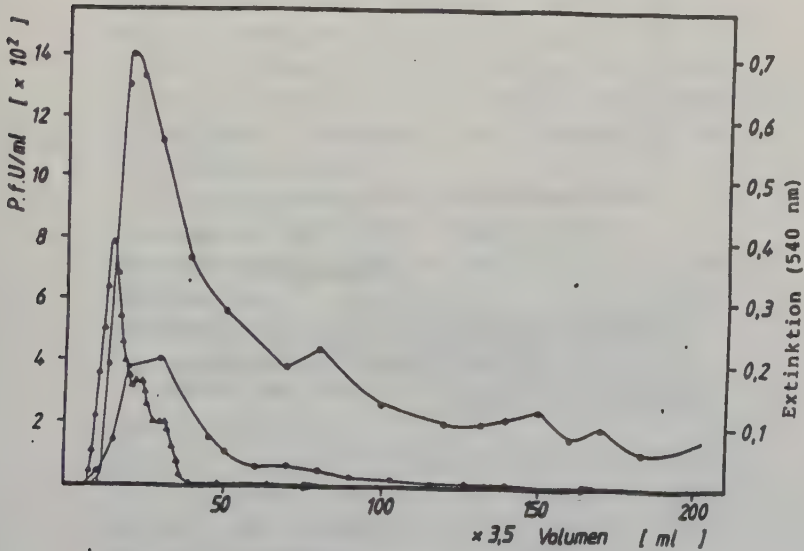


Abbildung 7 : Der kombinierte Einfluß der Temperatur und 2mM NaCl auf die Zurückhaltung von Polioviren I in der Säule. Δ--Δ Tracer. ●--● Temperaturbehandlung + Salz, O--O ohne Behandlung.

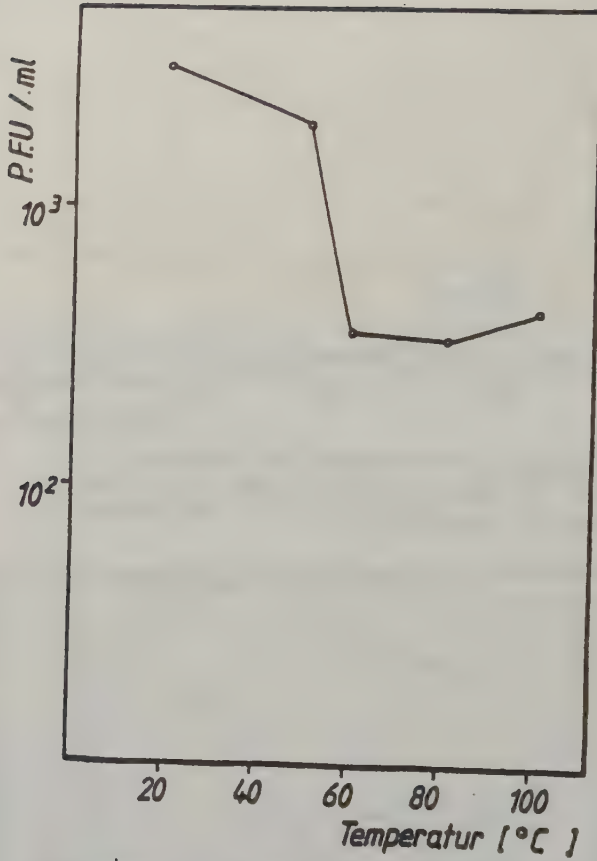


Abbildung 8 : Der Einfluß der Sandbehandlung mit verschiedenen Temperaturen auf die Adsorption der Polioviren I an den Sand. Die Angabe PFU/ml bezieht sich auf nicht-adsorbierte Viren.

5.3. Einfluß von verschiedenen Faktoren auf die Adsorption der Viren an Sand.

In diesem Teil des Vorhabens wurde das Bindungsvermögen des Bodens gegenüber Viren untersucht. Weil die Affinität von Viren zu Sand von einer Vielzahl von Faktoren abhängt, haben wir die Adsorptionsversuche unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Folgende Faktoren wurden geändert:

Virustyp.

Es ist bekannt, daß in Abwasser mehr als 100 unterschiedliche Virustypen vorkommen, alle mit Nukleokapsiden unterschiedlicher Zusammensetzung. Es würde einer großen Anstrengung bedürfen, wollte man die Adsorptionskinetik aller dieser Viren feststellen. Wir haben, wie schon bei den Überlebensversuchen praktiziert, fünf Virustypen für unsere Untersuchungen ausgesucht, vier Enteroviren und den Rotavirustyp SA-11.

Wasserqualität und im Wasser gelöste Stoffe.

Folgende Faktoren wurden berücksichtigt: pH, Ionenzusammensetzung, Wasserqualität (dest. Wasser, Grundwasser, biol. gereinigtes Abwasser, biologisch-chemisch gereinigtes Abwasser),

Hydraulische Faktoren.

Untersucht wurde der Einfluß der Kontaktzeit zwischen Viren und Sand, und der der Fließgeschwindigkeit und Menge des durchflossenen Wassers auf die Retention von Viren in Sandsäulen.

5.3.1 Batchversuche.

Die Adsorptions-Desorptions-Verhältnisse zwischen den Sandpartikeln und Viren wurde zuerst durch Batch-Versuche geprüft. Die Wechselwirkung zwischen den Sedimenten unterschiedlicher Korngrößen und mehreren Testviren wurde mit 4 Sandfraktionen-Grobsand, Mittelsand, Feinsand, kolloidale Partikel (kleiner als 0,02 mm) untersucht.

5.3.1.1 Untersuchung der Adsorption zwischen Viren und Sediment partikeln.

Die Verteilung zwischen den an der Partikeloberfläche adsorbierten und den frei suspendierten Viren wurde hier in Abhängigkeit von der Kontaktzeit geprüft. Anhand der Ergebnisse in Abb. 9 ist festzustellen, daß ein Gleichgewicht zwischen den adsorbierten und freien Viren relativ schnell auftritt. Die Polio I-Viren adsorbierten an die Sedimentpartikel am schnellsten. Sie wurden innerhalb von 30min zu ca. 99% gebunden. Die Cox Bl-Viren blieben in großer Anzahl frei in der Suspension.

Es ist von anderen Untersuchern bekannt, daß sich das Adsorptionsgleichgewicht zwischen Viren und Bodenbestandteilen unterschiedlich schnell einstellt. So wurden z.B. Polio III.-Lse innerhalb von 5 min zu 99,9 % von marinen Sedimentpartikeln gebunden (117). Goyal et al (110) stellten eine optimale Kontaktzeit von 30 min für die Adsorption von Enteroviren an 9 verschiedenen Böden fest. Bei unseren Untersuchungen erreichte die Adsorption von 4 Teststämmen schon innerhalb von 15 min einen relativ hohen Wert. Da eine Inaktivierung von Viren in

so kurzer Zeit unwesentlich ist, wurde bei weiteren Untersuchungen zur Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts eine Kontaktzeit von 30 min gewählt.

5.3.1.2 Einfluß der Sandmenge und der Viruskonzentration.

Durch diese Untersuchungen wurde zuerst das Adsorptionsverhalten der Viren in Abhängigkeit von der Menge und Korngröße des Sediments bei konstanter Expositionszeit untersucht. In den Abbildungen 10-13 ist die Adsorption von Viren bei 5 verschiedenen Sandeinwaagen dargestellt. Um eine übersichtliche graphische Darstellung zu erhalten ist die Adsorption als der negative Logarithmus der Größe: (nicht gebundene Viren)/(Gesamtvirenanzahl) angegeben ($-\log(V_f/V_g)$). Bei dieser Darstellungsform sind Adsorptionswerte von 90%; 99%; 99,9% etc. in den Abbildungen gut voneinander zu unterscheiden. Es ist zu bemerken, daß die Menge der kolloidalen Partikeln nur ein Zehntel der der anderen Sandsorten ausmachte.

Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, daß die Menge adsorbierter Viren mit zunehmender Menge der eingesetzten Sedimentpartikel zunimmt. Allerdings ist diese Zunahme erst ab einer Einwaage von 1 g der Grob-, Mittel- und Feinsandfraktionen deutlich zu erkennen. Vermutlich reichte die Anzahl eingesetzter Viren aus, um die Adsorptionsstellen der Sandoberfläche bei diesen niedrigen Einwaagen zu sättigen. Außerdem verwischte die hohe Konzentration der nicht adsorbierten Viren den geringfügigen Unterschied zwischen ihnen und den adsorbierten Viren bei diesen Proben.

Bei einer zweiten Versuchsreihe wurden unterschiedliche Konzentrationen von Polio I-Viren, mit jeweils

1,5 g der drei Sandarten und 0,15 g der kolloidalen Sandfraktion zusammengebracht und wie oben beschrieben behandelt. In Abb. 14 ist die Menge der adsorbierten Viren derjenigen der freien Viren gegenübergestellt. Die Ergebnisse zeigen, daß die Menge der adsorbierten Viren derjenigen der eingesetzten Viren proportional ist. Dieses ist zu erwarten, wenn man davon ausgeht, daß die Adsorptionsvorgänge von Viren an Sand sich mit der Freundlichen Isotherme beschreiben lassen.

5.3.1.3 Einfluß der Korngröße.

Die bisherigen Untersuchungen zeigten das unterschiedliche Adsorptionsverhalten der verschiedenen Viren gegenüber den unterschiedlichen Sedimentfraktionen. Abbildung 15 zeigt den Einfluß der Korngröße auf die Adsorption. Im allgemeinen war dieser Unterschied zwischen den Grob-, Mittel- und Feinsandfraktionen geringfügig. Die Adsorption zu kolloidalen Partikeln war viel besser als zu den anderen drei Fraktionen, obwohl die eingesetzte Menge zehnmal kleiner war. Deutlich zu sehen war die unterschiedliche Adsorptionsneigung der verschiedenen Viren; Polio I adsorbierte am besten, Coxsackie B1 am schlechtesten.

5.3.1.4 Einfluß des pH-Wertes.

Das Adsorptionsverhalten hängt stark vom pH-Wert der Umgebung ab. Durch ihre Proteinhülle besitzen Enteroviren einen amphoteren Charakter; ihr isoelektrischer Punkt liegt im sauren Bereich, daher sind sie bei neutralem pH-Wert stets negativ geladen. Dagegen ist die Ladung von Sandpartikeln, über einen breiten pH-Bereich negativ. Abb. 16 zeigt die Adsorption der untersuchten Virenstämme in Ab-

hängigkeit des pH-Wertes der umgebenden Lösung. Die maximale Adsorption findet bei der höchsten Protonen-Konzentration statt. Im alkalischen Bereich konnte keine Adsorption festgestellt werden.

Ein viruspezifischer Charakter der Adsorption machte sich auch hier bemerkbar: Sie war wiederum bei Polio I-Viren am stärksten, bei Cox.-Bl-Viren am schwächsten.

5.3.1.5 Einfluß der Kationen.

Nach klassischer bodenkundlicher Ionenaustauschtheorie umgibt eine elektrische Doppelschicht die negativ geladene Oberfläche der Bodenpartikel. Die in der Umgebung vorhandenen Kationen können die Adsorption der Viren an den Sand dadurch verstärken, daß sie Kationenbrücken zwischen den negativ geladenen Viren und den Sandpartikeln binden und die negative Ladung am Sand verringern, so daß die Viren sich an die Sandpartikeln anlagern können.

Die Versuche wurden mit zweiwertigen und einwertigen Kationen durchgeführt. In den Versuchen wurde die Wirkung der Kationen auf die Adsorption von Poliovirus I und Rota SA-11-Virus an ein Sandgemisch geprüft. Die Kationenkonzentration war 20 mM.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 17,18 zusammengefasst, die die Abhängigkeit des Adsorptionsgrades von der Wertigkeit der Kationen zeigen. Mit der Zunahme der Kationenwertigkeit stieg die Adsorption der Viren auf 5-30 % an. Na^+ hatte den geringsten Einfluß und bei Ca^{++} war der Einfluß am stärksten. Das Vorhandensein der Kationen in der Umgebung verstärkt die Adsorption von Rota SA-11-Virus eher als die von Poliovirus, weil die

Poliioviren am Sand ohnehin Stärker adsorbieren. Deshalb kommt die Wirkung von Kationen auf die Adsorption Von Rota SA-11 stärker zum Ausdruck.

Anhand dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß die Adsorption der Viren an Sand durch die Wertigkeit der Kationen beeinflufbar ist und die Adsorption virusspezifisch ist.

5.3.1.6 Einfluß der Huminsäure.

Die im Abwasser vorhandenen organischen Stoffe können die Adsorption der Viren am Sand stören, weil sie um die Adsorptionsstellen an den Sandpartikeln mit den Viren konkurrieren.

Wir haben den Einfluß der Huminsäure bei verschiedenen Konzentrationen untersucht. Die Wirkung der Huminsäure auf die Adsorption der Viren wird in Abbildung 19 gezeigt. Der stärkste Einfluß der Huminsäure wurde bei Konzentrationen zwischen 0.1 und 0.05 mg/ml festgestellt.

Bei höheren Konzentrationen scheint es, als ob die Huminsäure bei solchen Konzentrationen die Adsorption der Viren weniger stört. Der niedrige Virustiter im Überstand kann auf einer Verklumpung der Viren durch die in hohen Konzentrationen in der Suspension vorhandene Huminsäure zurückgeführt werden. Huminsäure ohne Sand hat keine Verklumpung der Viren verursacht.

Niedrigere Huminsäurekonzentrationen als 0.01 mg/ml haben keine außergewöhnliche Wirkung auf die Adsorption der Viren gezeigt.

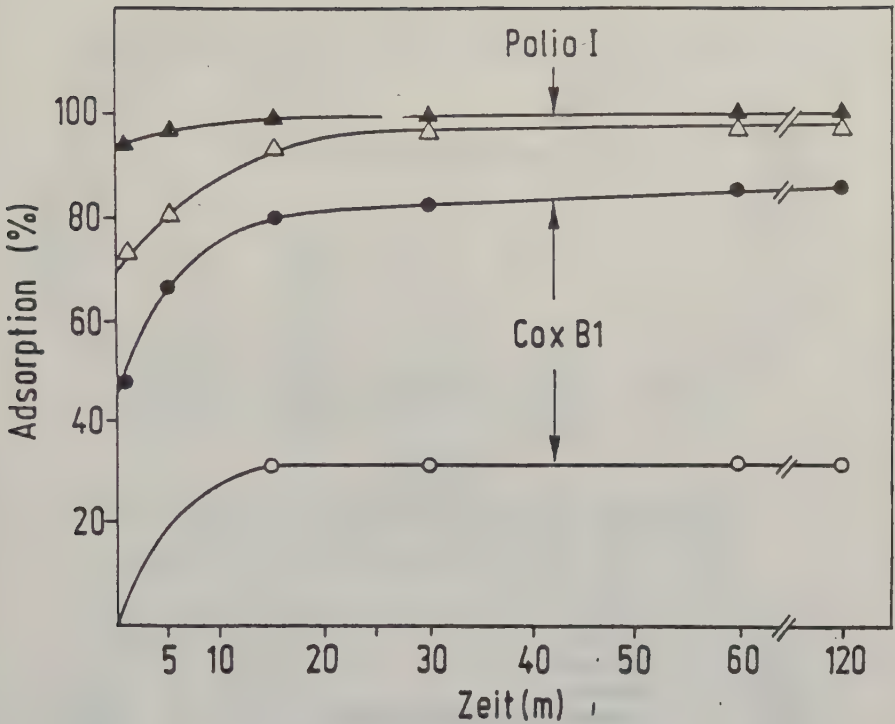


Abbildung 9 : Adsorption von Polio I und Cox B1 Viren an einem Gramm Sand (kleiner als 1mm) oder an einem Gramm kolloidaler Partikel (kleiner als 0.02 mm) in Abhängigkeit von der Zeit.

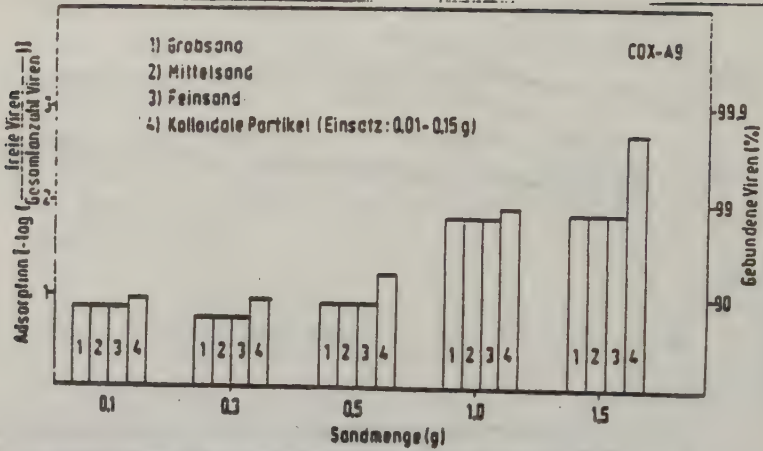


Abbildung 10 : Prozentualer Anteil von adsorbierten Cox A9 in Abhängigkeit der Sandmenge in der sie inkubiert wurden. Flüssige Phase : Dest. Wasser. Inkubationszeit : 30 Minuten.

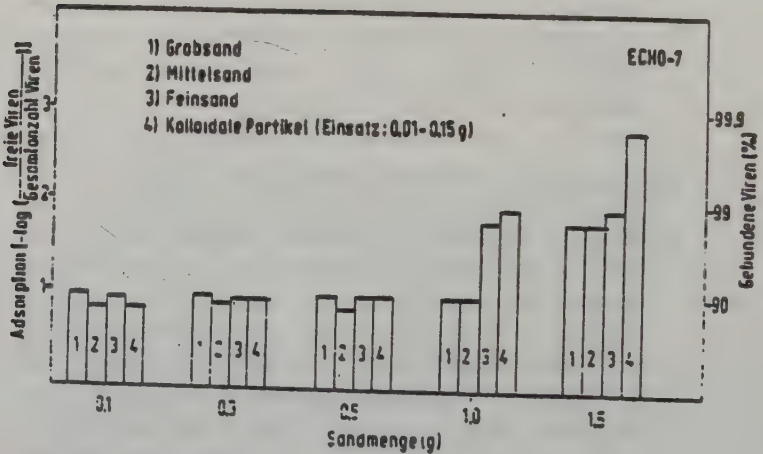


Abbildung 11 : Wie Abb. 10, Für Echo 7.

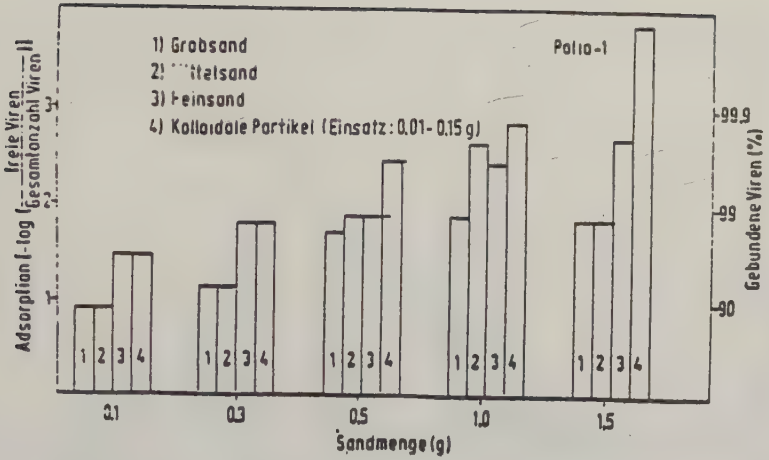


Abbildung 12 : Wie Abb. 10, für Polio I.

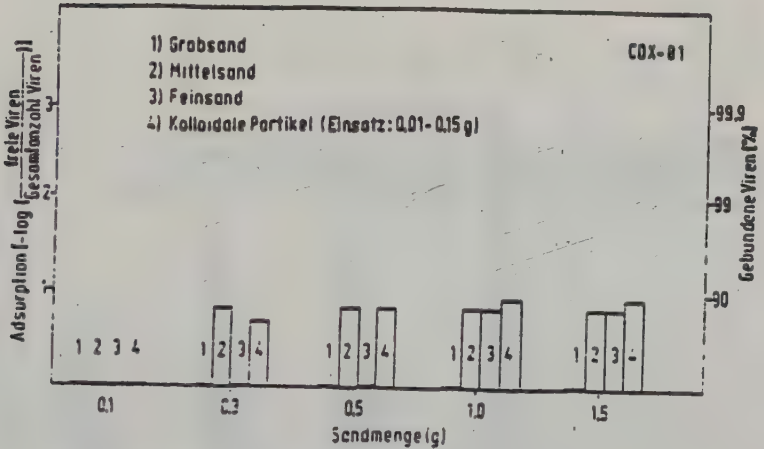


Abbildung 13 : Wie Abb. 10, für Cox B1.

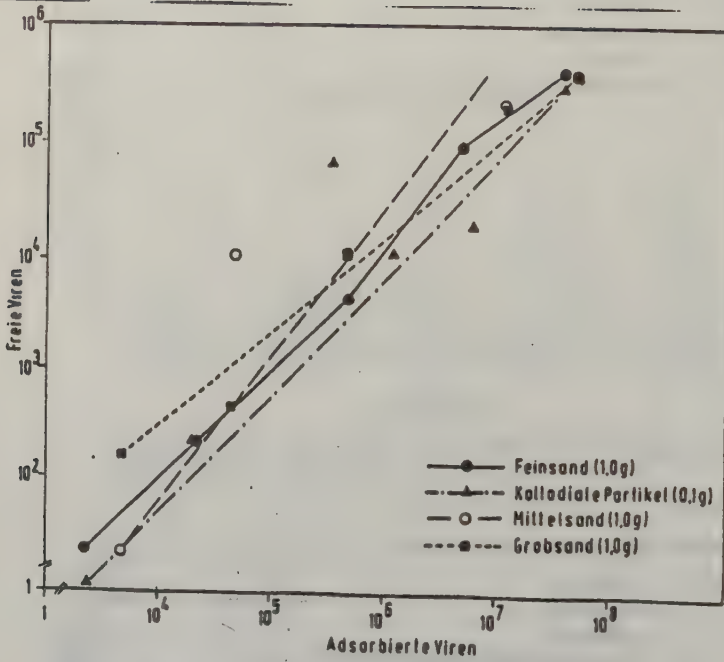


Abbildung 14 : Freie, nicht adsorbierte Cox B1, gegen gebundene Viren nach Inkubation mit 1.5 g der unterschiedlichen Sandfraktionen in 5 ml dest. Wasser für 30 min. pH 6-6.5.

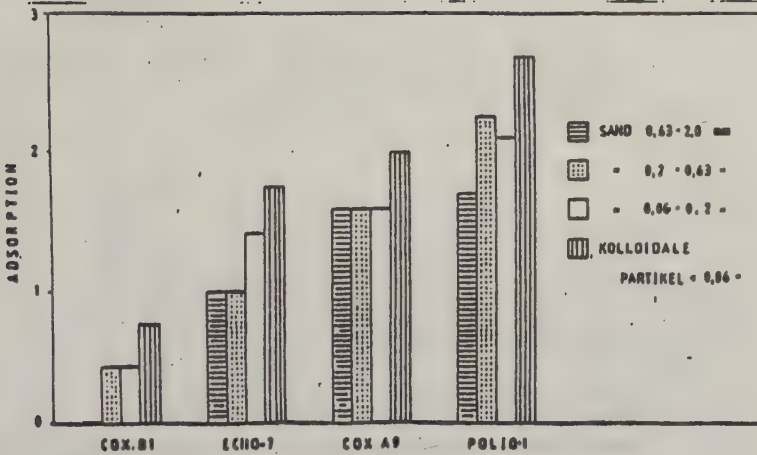


Abbildung 15 : Einfluß der Körngröße auf die Adsorption von verschiedenen Enteroviren in dest. Wasser. Es wurden jeweils 1.5 g Sand, aber nur 0.15 g kolloidale Partikeln eingesetzt.

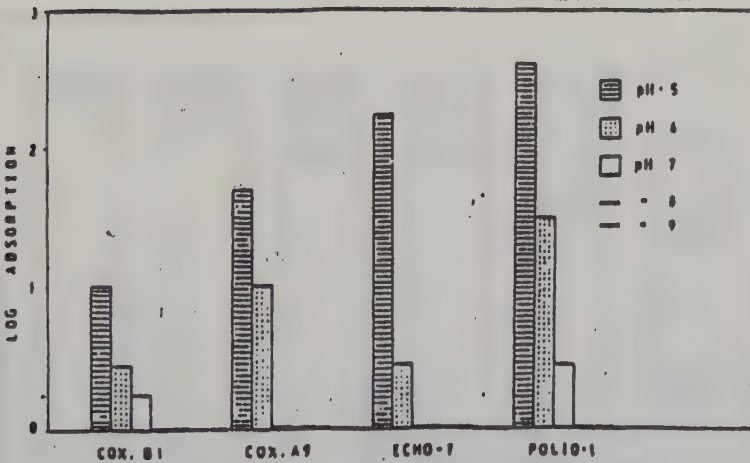


Abbildung 16 : Einfluß des pH-Wertes auf die Adsorption einiger menschenpathogener Enteroviren an Sand. (kleiner als 1mm).

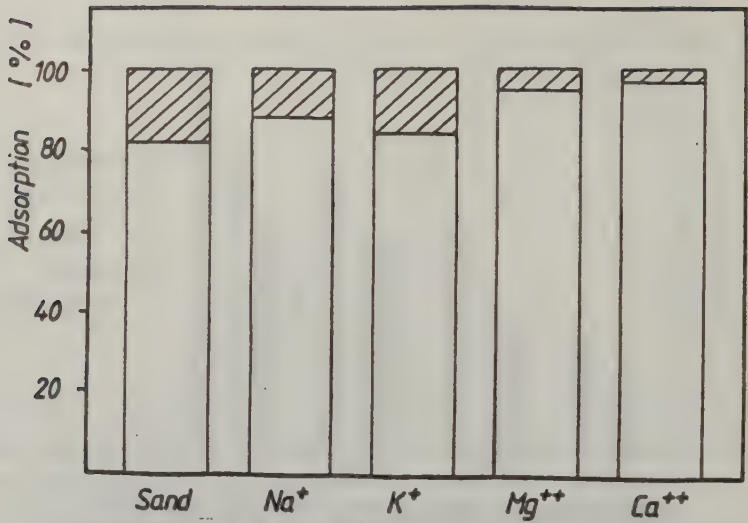


Abbildung 17 : Die Abhängigkeit der Adsorption von Polioviren I von der Kationenwertigkeit (20mM).
 □ adsorbierte Viren, ▨ nicht adsorbierte Viren.

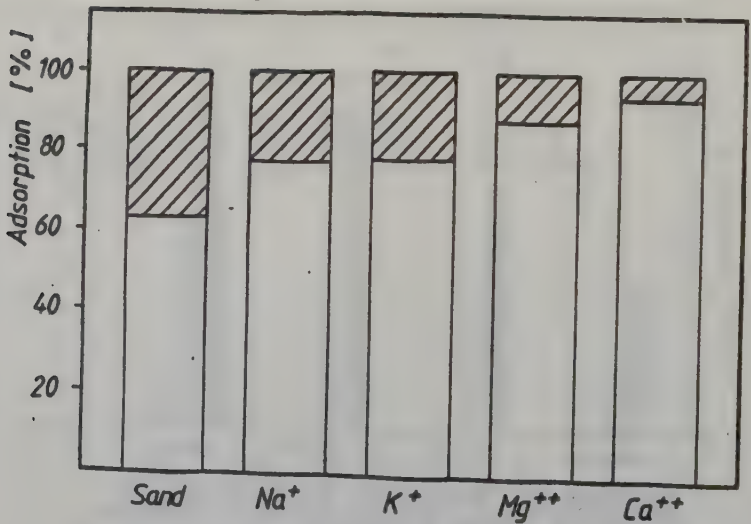


Abbildung 18 : Die Abhängigkeit der Adsorption von Rota SA-11 Viren von der Kationenwertigkeit (20mM).
 □ adsorbierte Viren, ▨ nicht adsorbierte Viren.

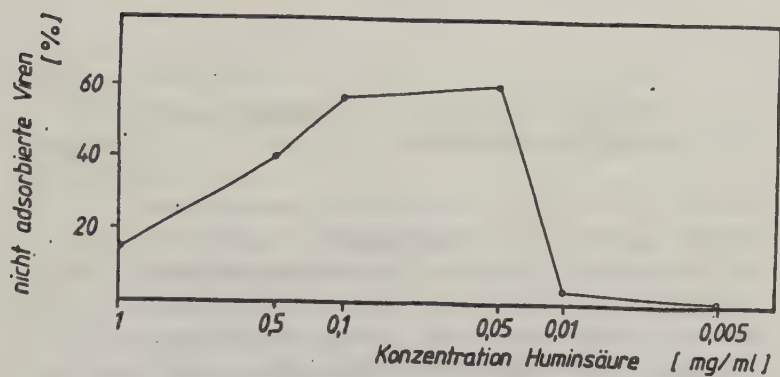


Abbildung 19 : Der Einfluß von Huminsäure auf die Adsorption von Polioviren I an Sand.

5.3.2 Transport von Viren in Sandsäulen unter verschiedenen Bedingungen.

Aufgrund ihrer in Batchversuche nachgewiesenen geringen Adsorption an Sandpartikel wurden die Cox Bl-Viren als Testkultur für die Säulenversuche herangezogen. Da sich die Grob-, Mittel- und Feinsandfraktionen hinsichtlich ihrer Adsorptionseffektivität voneinander nur unwesentlich unterschieden, diente ein Sandgemisch von einer Körnung kleiner als 1 mm als Füllmaterial der Säule (s. Methodik).

Vor dem Beginn des Vorhabens hatten wir beabsichtigt, die Säulen mit Hilfe einiger Milliliter Virussuspension mit Viren zu beladen, die Säulen an ein Wasserreservoir anzuschließen, das Eluat zu fraktionieren und die Viren in den Fraktionen zu quantifizieren, um dann festzustellen, wie sie vom Sand zurückgehalten werden. Damit wollten wir den Verzögerungsfaktor der Viren in der Säule direkt feststellen. Diese experimentelle Anordnung stellte sich im Laufe der Versuche als unpraktikabel heraus. Bei manchen Versuchen konnten wir keinen Durchbruch der Viren innerhalb einer vierzehntägigen Beobachtungszeit ermitteln. Bei anderen Versuchen konnten wir bereits nach einem kleinen Elutionsvolumen feststellen, daß geringe Mengen Viren (weniger als 0,1%/Tag) aus der Säule traten. Wir vermuten, daß dieses ständige Durchsickern von Viren Folge von Wandeffekten und anderen Fehlerquellen war; die Säulen konnten bei aller Sorgfalt nicht immer identisch gepackt werden.

Wir gewannen den Eindruck, daß es durch die lange Zeit, die erforderlich gewesen wäre, um einen "Peak" von Viren aus der Säule zu eluieren, zu einer signifi-

kanten Inaktivierung der Viren kommen würde. Das wiederum würde zu einer Verwischung der Transportparameter führen, deren Untersuchung das Hauptziel der Säulenversuche war.

Aus diesen Gründen entschieden wir uns für eine andere Versuchsanordnung: Nicht nur die eluierten Viren sollten quantifiziert werden, sondern diejenigen Viren die nach dem Auswaschen der Säule mit einer bestimmten Menge Wasser in der Säule verblieben waren. Auf diese Weise war es möglich, die unterschiedlichen Versuche miteinander zu vergleichen. Die Fraktionierung der Säulenfüllung wurde in "Material und Methoden" beschrieben.

5.3.2.1 Einfluß der Wasserqualität auf die Eindringtiefe von Viren.

Pathogene Viren können nach Leckagen in Abwasserleitungen in den Untergrund gelangen, wobei das durchgesickerte Abwasser völlig unbehandelt oder aber mechanisch, biologisch etc. behandelt gewesen sein kann. Viren können nach heftigen Regenfällen mit dem Regenwasser aus Rieselfeldern, Deponien etc. in den Untergrund mitgerissen werden. Um zu einer allgemeingültigen Aussage über die Eindringtiefe von Viren zu kommen, müssen diese unterschiedlichen Umstände berücksichtigt werden.

Für diese Versuche wurden vier Wasserarten gewählt, die von Bedeutung für den Virentransport ins Grundwasser sein können. Die Wasserarten sind Grundwasser, destilliertes Wasser, biologisch behandeltes Abwasser, das durch Belebtschlammverfahren behandelt wurde und weitergehend behandeltes Abwasser. Die Behandlung besteht aus Flockung, Filtration und Ozonung.

Die in den Versuchen benutzten Enteroviren sind Poliovirus I, Coxsackievirus A9, Echovirus-7, Coxsackievirus B1, Rotavirus SA-11.

In Abbildung 20 wurden die Ergebnisse mit destilliertem Wasser dargestellt. Da die Gewinnungstüchtigkeit des Nutrient Broths nicht 100 % ist und ein Teil der Viren inaktiviert wird, haben wir die eluierten Viren gleich 100 % gesetzt. Die Viren sind in den ersten 8 cm der Säule nachweisbar gewesen. 90 -100 % der Viren sind in den ersten 5 cm adsorbiert geblieben. Im Säuleneluat wurden keine Viren ermittelt.

In Abbildung 21 wurden die Ergebnisse vom Grundwassertest zusammengefasst. Nur das Rotavirus wurde in allen Fraktionen ermittelt. 100 % der anderen Viren sind in den ersten 5 cm der Säule adsorbiert geblieben. Von den Poliovirus I und Echovirus- 7 adsorbierten ca. 100 % in den ersten 2 cm. Die Viren im Eluat waren nicht nachweisbar.

Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse des Versuches mit weitergehend behandeltem Abwasser. Das Cox-B1 war in Portionen von 5-20 % in der Sandsäule verteilt. 90-100 % der anderen Viren adsorbierten in den ersten 5 cm der Säule. Von den Viren Polio I, Coxsackie B1, Coxsackie A9 und Rota SA-11 wurden ca. 10^5 PFU im Eluat ermittelt. Das Echo 7 war im Eluat nicht nachweisbar.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse mit biologisch behandeltem Abwasser dargestellt. Die Viren waren in unterschiedlichen Portionen in der Säule verteilt. 80-100 % der Polio I, Coxsackie A9, Echo 7 adsorbierten in den ersten 5 cm, während Rotavirus SA-11 und Coxsackie B1 in Portionen von 5-25 % in den Sandfraktionen verteilt waren.

Alle Viren wurden innerhalb der ersten 5 cm der Säule zu 95-99 % zurückgehalten. Bei Verwendung von biologisch behandeltem Abwasser wurden die Cox Bl-Viren und die Rota SA-11-Viren bei in allen Schichten der Säule mehr als anderen Viren nachgewiesen.

Es fällt auf, daß das biologisch behandelte Abwasser die höchste Eindringtiefe erlaubte, was vermutlich auf den hohen Gehalt an organischen Substanzen in diesem Abwasser zurückzuführen ist. Das gleiche Abwasser nach einer weiteren chemischen Reinigungsstufe zeigte geringere Mobilisierungswirkung auf die Viren als das biologisch behandelte Abwasser. Nur das Cox Bl-Virus wurde in allen Fraktionen der Säule nachgewiesen. Das weist darauf hin, daß bei dieser Reinigungsstufe einen großer Teil des im Abwasser vorhandenen organischen Materials beseitigt wird.

Mit dest. Wasser drangen die Viren tiefer in die Säule ein als mit Grundwasser obwohl nicht so tief wie mit biol. gereinigtem Abwasser. Dieses findet seine Erklärung in der unterschiedlichen Ionenstärke beider Wasserarten.

Um für eine spätere Beurteilung einen gewissen Sicherheitsspielraum zu gewinnen, haben wir die weiteren Versuche nicht mit Grundwasser, sondern mit dest. Wasser durchgeführt. Damit wollten wir bezwecken, daß die gewonnenen Ergebnisse auf jeden Fall ungünstiger ausfallen, als sie in Wirklichkeit mit Grundwasser ausfallen würden. Wichtige Adsorptionsversuche haben wir mit beiden Sorten Wasser durchgeführt. Dabei zeigte sich immer, daß erwartungsgemäß Grundwasser zur besseren Adsorption

führt.

5.3.2.2 Einfluß der Fließgeschwindigkeit des Wassers auf den Transport der Viren.

Das Transportverhalten von Viren wurde bei Abstandsgeschwindigkeiten von 0,6; 1; 2,1 und 5,1 m/Tag geprüft, wobei die Menge des durchfließenden dest. Wassers und die Gesamtfließstrecke konstant blieben (1200 ml dest. Wasser: 528 cm Fließweg) ("Abstandsweg"). Auf die Einstellung von Fließgeschwindigkeiten wurde in der Methodik detailliert eingegangen. Die Verteilung der in der Säule zurückgehaltenen Cox.-Bl-Viren wurde nach Elution der Sandschichten mit einer Nutrient-Broth-Lösung bestimmt (s. Methodik) und in Abb. 24 dargestellt.

Als erstes charakteristisches Merkmal machte sich die Zurückhaltung der Cox.-Bl-Viren innerhalb von 3-5 cm der Säule bemerkbar. Bei allen geprüften Fließgeschwindigkeiten blieben mehr als 90 % der Viren innerhalb der ersten 3 cm. Der Einfluß der Fließgeschwindigkeit auf die Eindringtiefe der Viren wird deutlich, wenn man die Menge Viren im fünften Zentimeter der Säule gegen die Fließgeschwindigkeit aufträgt (Abb.24, eingerahmt). In dieser Tiefe von 5 cm betrug der Anteil wiedergefundener Viren mit zunehmender Fließgeschwindigkeit 0,01 %, 0,49 %, 1,42 %, und 2,73 %.

In keiner der Eluatfraktionen waren Viren zu finden. Deswegen konnte die gesamte Säulenhöhe bei der Berechnung der Abstandsgeschwindigkeit von Viren nicht verwertet werden. Vielmehr wurde als Transportstrecke die Säulenhöhe genommen, in der ein bestimmter prozentualer Anteil (90 u. 99 %) der Viren haften

blieb.

Die Relation der Fließgeschwindigkeit des Wassers zur Transportgeschwindigkeit der Viren, der sog. Verzögerungsfaktor, (Rd-Wert), wurde berechnet und in den Tab. 7a und 7b wiedergegeben. Die Tabellen geben gleichzeitig die Fließ- bzw. Transportstrecke der Viren an, die unter Versuchsbedingungen in der Säule innerhalb von 50 Tagen zurückgelegt worden wären.

Tabelle 7a: Eindringtiefe, Sickergeschwindigkeit, Rd-Wert und 50-Tage-Eindringtiefe von Cox.B1-Viren für die langsamsten 90 % der eingegebenen Viren.

Vw (m/d)	maximale Eindringtiefe (cm)	Vv (max.) (cm/d)	Rd $\frac{Vw}{Vvmax}$	max. Transport in 50 Tagen (cm)
0.6	2	0.6	90.3	29
1	0.25	1.4	73.6	70
2	3	3.5	59.6	173
5.1	4	9.2	44.8	461

Tabelle 7b: Wie in Tabelle 7a, für die langsamsten 99 % der Viren.

Vw (m/d)	maximale Eindringtiefe	Vv (max.) (cm)	Rd $\frac{Vw}{Vvmax}$	max. Transport in 50 Tagen (cm)
0.6	3	0.9	60.2	43
1	4	2.2	46	112
2	5	5.8	35.8	288
5.1	6	13.8	30	691

Wie aus den Ergebnissen zu entnehmen ist, werden die Viren in der Säule sehr verzögert. Bei allen Versuchen liegen die Verzögerungsraten zwischen 30 und 90, die hochgerechnete 50-Tage Transportstrecke lag zwischen 29 und 691 cm.

Mit zunehmender Wasserfließgeschwindigkeit gehen die Rd-Werte zurück und die Viruswerte für die 50-Tage-Transportstrecke steigen an. Es ist selbstverständlich, daß die Rd-Werte, die für die Transportstrecke von 99 %igen Viruseliminationen berechnet wurden, niedriger sind als die Vergleichswerte für eine 90 %ige Elimination.

Beim Arbeiten mit Säulen lassen sich Wandeffekte und andere analytische Fehlerquellen nicht vollständig ausschalten. Es ist davon auszugehen, daß sehr

kleine Werte in einer größeren Säulentiefe nicht unbedingt repräsentativ für das Modellsystem sind, sondern auf solchen Fehlern beruhen. Daher diene bei den weiteren Untersuchungen für die Errechnung von R_d -Werten die Strecke als Grundlage, bei der 99 % der Viren zurückgehalten wurden.

Zieht man aus den Ergebnissen Schlußfolgerungen für die Praxis, ist innerhalb der hier getesteten Grenzen der Einfluß der Wasserfließgeschwindigkeit auf den Transport von Viren aufgrund des hohen Rückhaltevermögens des Sandes zu vernachlässigen. Nach 50 Tagen und bei einer Wasserabstandsgeschwindigkeit von 0,5 m/d würden 99 % der Viren weniger als 43 cm zurückgelegt haben; und 852 cm bei einer Wasserabstandsgeschwindigkeit von 5 m/d.

5.3.2.3. Einfluß des Gesamtelutionsvolumens auf den Transport von Cox Bl-Viren:

In diesen Versuchen haben wir die Eindringtiefe der Viren in Abhängigkeit der Gesamtmenge des durchflossenen Wassers festgestellt. Die Ergebnisse sollten auf die Frage Auskunft geben, ob die Eindringtiefe von Viren der Elutionsmenge proportional ist. Die Säulen wurden bei einer konstanten Abstandsgeschwindigkeit von 2 m/d mit Durchflußmengen von 2, 4 und 10 l Wasser durchspült. Abb.25 zeigt die Verteilung der Viren in den verschiedenen Säulenschichten. Wie ersichtlich, wurden die Cox.-Bl-Viren bei allen Durchbruchvolumina wiederum hauptsächlich in oberen Säulenschichten zurückgehalten. Mehr als 90 % der Viren blieben bei allen Versuchen in den ersten 6 cm haften. Bei einer Wassermenge von 2,0 l war der prozentuale Anteil von Viren im ersten Zentimeter 30,0 %, während es bei einem

Durchbruchsvolumen von 4,0 Liter 6,67 % und bei 10,0 Liter 4,42 % betrug. Bis zu einer Säulentiefe von 3 cm waren von den eingesetzten Viren bei den entsprechenden Durchflußmengen 30, 31 und 44 % nachzuweisen.

Zwischen der Durchflußmenge an Wasser und der Eindringtiefe der Viren ist ein deutlicher Zusammenhang festzustellen. In tieferen Schichten waren umso mehr Viren zu finden je größer das Durchflußvolumen gewesen war.

Tabelle 8: Transportparameter von Cox Bl-Viren in Abhängigkeit der durchflossenen Wassermenge.

Durchfluß- volumen (ml)	Versuchs- dauer (Tage)	Fließ- strecke, Wasser* (m)	Eindring- tiefe** Viren (m)	Transport geschwin- digkeit, Viren (cm/d)	Rd-Wert	Eindring- tiefe in 50 Tage (cm)
2.000	1.7	3	5	3	60	149
4.000	3.3	6	8	22	75	112
10.000	8.4	15	8	96	190	48

* Die Wasserfließstrecke wurde aus der Abstandsge-
schwindigkeit, Nutzporenvolumen des Füllmaterialies,
Durchmesser der Säule und Durchflußvolumen er-
rechnet.

** Maximale Eindringtiefe von 99 % der eingedetzten

Viren, d.h. weniger als 1 % der Viren sind über diese Tiefe hinweggekommen.

Die in Tabelle 8 angegebenen Virengeschwindigkeiten werden mit zunehmendem Durchflußvolumen kleiner bzw. die daraus errechneten Rd-Werte werden größer. Dieses bedeutet, daß entweder die Geschwindigkeit der Viren im Sand mit zunehmendem Fließvolumen tatsächlich kleiner wird, was wir nicht interpretieren könnten, oder daß wir mit zunehmendem Durchflußvolumen die Virusgeschwindigkeiten akkurater bestimmen könnten und wir bei den kleineren Durchflußvolumina diese Geschwindigkeit überschätzt haben. Die zweite Interpretation ist wahrscheinlicher: Die Sandoberfläche der Säulen kann in der Regel nicht so plan und glatt gehalten werden wie es wünschenswert wäre. Daher dringen die Viren, bereits beim Auftragen, leicht in die ersten 2 Zentimeter der Säule ein. Dort findet man sie, auch ohne oder bei wenig durchgeflossenen Wasser, wieder. Dieser Umstand ist nicht beunruhigend, da dadurch die Virengeschwindigkeiten nicht unter-, sondern überschätzt werden, was vom Sicherheitsstandpunkt aus unbedenklich ist.

5.3.2.4 Einfluß des pH-Wertes auf das Transportverhalten von Cox Bl-Viren:

Im allgemeinen hat das mechanisch bzw. biologisch gereinigte Abwasser einen alkalischen oder neutralen Charakter. Der pH-Wert des Bodenwassers ist dagegen je nach den physiko-chemischen Milieubedingungen unterschiedlich. In den meisten Abwasserverrieselungsanlagen, sowie in den meisten Wäldern, hat das Bodenwasser aufgrund der Abbau des organischer Inhaltsstoffe zu organischen Säuren einen niedrigen

pH. Dies beeinflusst je nach der örtlichen Struktur des Bodens den pH-Wert und die Beschaffenheit des Grundwassers. Da die Batchversuche eine Abhängigkeit der Adsorptionsvorgänge vom pH-Wert der Umgebung ergaben, wurde bei diesen Untersuchungen die Eindringtiefe von Cox Bl-Viren bei verschiedenen pH-Werten getestet.

Das Wasser wurde mit 0,1 n HCl bzw. NaOH auf die pH-Werte 5,0; 7,0 und 8,0 eingestellt. Wasser mit dem später zu verwendeten pH-Wert floß vor jedem Versuch so lange durch die Säule, bis das ein- und auslaufende Wasser den gleichen pH-Wert hatte. Dann wurde die Virussuspension der Säule zugeführt und die Eluatfraktionen gesammelt. In Abb. 26 sind die prozentualen Verteilungsraten der Viren in den verschiedenen Schichten der Säule angegeben.

Die ausgeprägteste Rückhaltung der Viren tritt beim niedrigsten pH-Wert auf. Mit zunehmendem pH-Wert des Mediums erreichten sie tiefere Schichten der Säulen. So waren sie z.B. im ersten Zentimeter bei den pH-Werten von 5,0, 6,8 und 8,0 in einem prozentualen Anteil von jeweils 34 %, 30 % und 10 %. Diese Werte betrugen in der 3 cm-Schicht bei gleichen pH-Werten jeweils 12 %, 30 %, und 23 %. Bei pH 8 ließen sich Viren in fast allen gesammelten Eluatfraktionen dauernd nachweisen. Das Titer dieser Fraktionen wies allerdings kein Maximum auf, d.h., alle Fraktionen (jeweils 5 ml) hatten etwa die gleiche Konzentration.

Die Verzögerungsfaktoren und die möglichen Transportstrecken der Viren innerhalb von 50 Tagen wird in Tab. 9 angegeben.

Tabelle 9: Transportparameter für Cox.-Bl-Viren
in Abhängigkeit vom pH-Wert des eluierten
Wassers.

pH-Wert	Fließ- strecke, Wasser (m)	Eindring- tiefe Viren (cm)	Transportge- schwindigkeit Viren (cm/d)	Rd-Wert	Eindring- tiefe in 50 Tagen (cm)
5.0	1.8	5	5.7	40	287
7.0	1.8	6	6.9	30	344
8.0	1.8	10	11.5	18	574

Eine deutliche Zunahme des Rd-Wertes mit steigender Protonenkonzentration des Wassers ist auch hier zu erkennen. Bei einem pH-Wert von 8 erwies sich der Verzögerungsfaktor mit 18 als der geringste aller Säulenversuchsansätze. Mit einer Transportstrecke von über 5,8 m ist für 1 % der gegebenen Viren innerhalb von 50 Tagen bei pH 8 zu rechnen, während sie bei pH sieben 3,4 m und bei pH fünf 2,9 m betragen würde.

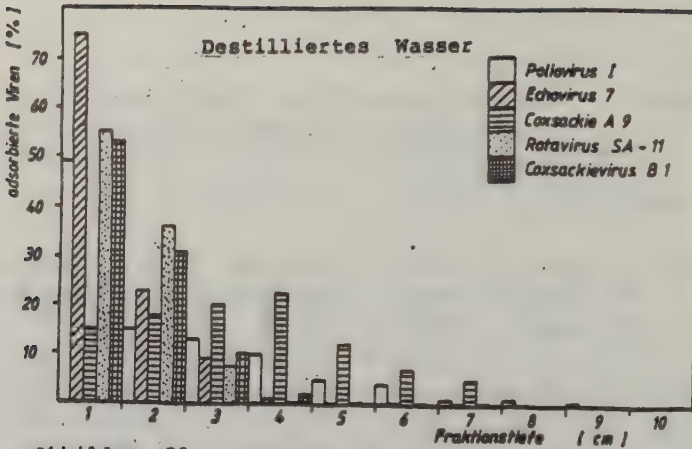


Abbildung 20 : Prozentuale Verteilung von verschiedenen Viren in Säulen, die mit destilliertem Wasser eluiert wurden. 1200 ml, 2 m/d.

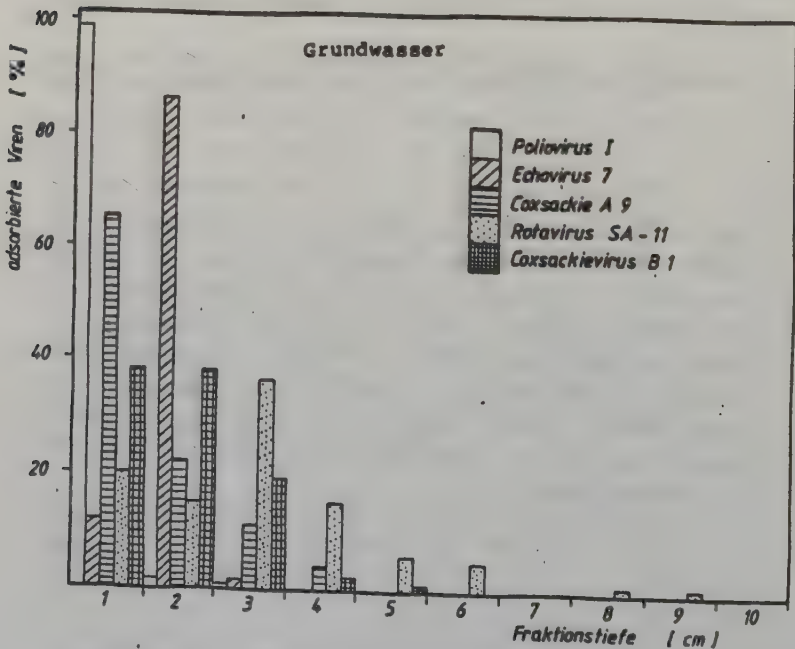


Abbildung 21 : Wie Abb.20, mit Grundwasser.

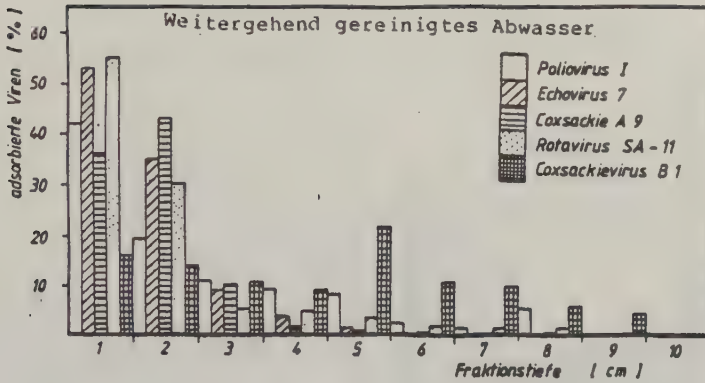


Abbildung 22 : Wie Abb. 20, mit weitergehend gereinigtem Abwasser.

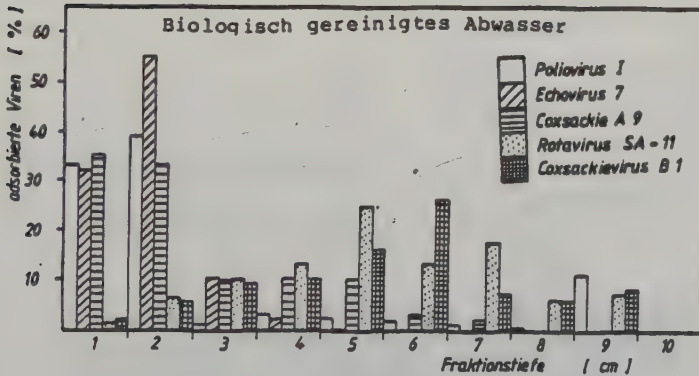


Abbildung 23 : Wie Abb. 20, mit biologisch behandeltem Abwasser.

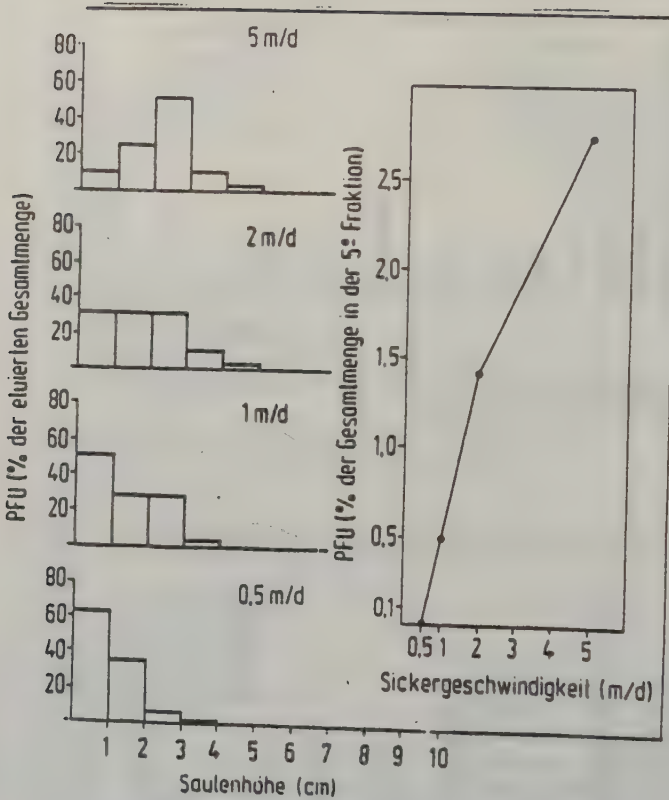
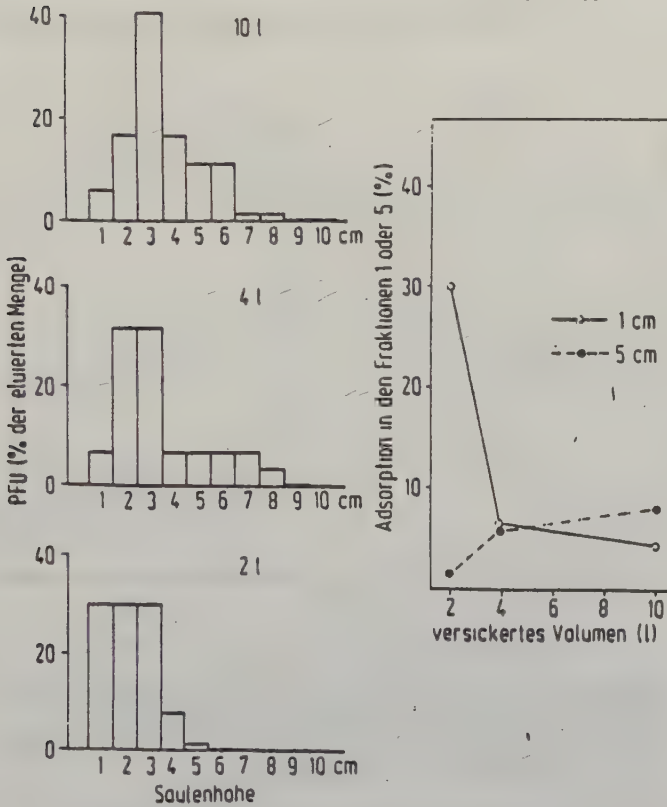


Abbildung 24 : Prozentuale Verteilung von Cox-B1 Viren entlang von Säulen, eluiert bei unterschiedlichen Abstandsgeschwindigkeiten mit dest. Wasser. Elutionsvolumen 1200ml. Eingerahmter Teil: Prozentualer Anteil im fünften cm in Abhängigkeit von der Abstandsgeschwindigkeit.

Säule: 5 cm Φ , gefüllt mit Sand < 1 mm Φ , Fließgeschw. 2 m/d
Eluant: dest. Wasser



Abbildungung 25 : Prozentuale Verteilung von Cox-B1 Viren entlang von Säulen, die mit unterschiedlichen Wassermengen eluiert wurden. Die Abstandsgeschwindigkeit betrug 2 m/d. Eingerahmter Teil: Zur besseren Veranschaulichung ist der Anteil Viren im ersten und im fünften cm in Abhängigkeit des Durchfluvolumens aufgetragen.

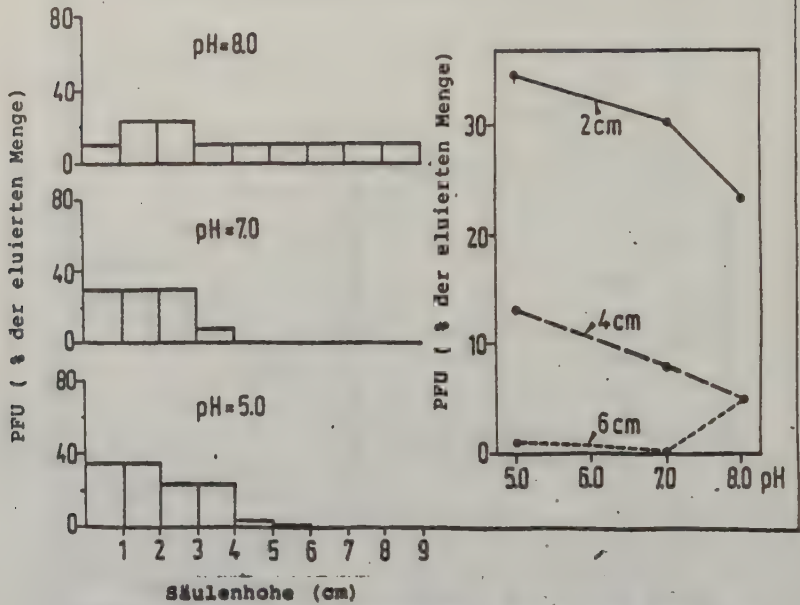


Abbildung 26 : Prozentuale Verteilung von Cox-B1 Viren entlang von Säulen in Abhängigkeit vom pH-Wert des eluierenden Wassers. Elutionsvolumen 1200 ml. Eingrahmter Teil: Anteil der Viren in verschiedenen Höhen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

6. Diskussion der Ergebnisse.

Der wichtigste Punkt, der bei der Behandlung von Abwasser durch Sandfiltration berücksichtigt werden muß, ist das Schicksal der im Abwasser vorhandenen pathogenen Viren und Bakterien während ihres Kontakts mit dem Boden.

Die Wanderung der Viren ins Grundwasser wird von der Überlebensdauer der Viren im Boden und der Retentionskapazität des Bodens gegenüber den Viren beeinflusst.

Die mit der Abwasserbehandlung verbundene gesundheitliche Gefährdung kann nur verhindert werden, indem geeignete Bedingungen für eine optimale Beseitigung von Viren und Bakterien geschaffen werden. Voraussetzung hierfür ist ein besseres Verständnis der Mechanismen ihrer Beseitigung durch Bodenfiltration und der Faktoren, die diese Mechanismen beeinflussen.

In dieser Studie wurde der Inaktivierungsverlauf von vier verschiedenen Enteroviren und einer Rotavirusart unter gleichen Bedingungen, wie sie im Untergrund herrschen, beobachtet.

Es wurde gezeigt, daß die Viren im Grundwasser lange Zeit infektiös bleiben. Nach ca. 300 Tagen blieben entsprechend dem Anfangstiter 10^2 - 10^6 PFU/ml der Viren aktiv in der Suspension. Die getesteten Viren unterschieden sich hinsichtlich ihrer Überlebensdauer im Grundwasser. Die Polio- und Echo7-Viren zeigten die niedrigste Titerabnahme. Ihrer Titer wurde um ein log verringert. Bei den Cox Bl-, Cox A9- und Rota SA-Viren war die Titerabnahme höher

und betrug zwei log. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die durch Abwasserversickerung ins Grundwasser gelangenden Viren sehr lange Zeit infektiösfähig bleiben und bei der Grundwasserwiederbenutzung berücksichtigt werden müssen.

Bei dem Versuch mit Rota SA-11-Viren wurde zusätzlich die Inaktivierung der Viren in mit Grundwasser gesättigtem Sand beobachtet. Nach 60 Tagen wurden die Viren in dieser Versuchsreihe völlig inaktiviert, während in den beiden anderen Versuchsreihen im Grundwasser nach 100 Tagen nur 2 log der eingegebenen Viren inaktiviert wurden.

Da die Temperatur bei allen Versuchen bei 10°C konstant gehalten wurde, kann der Unterschied im Inaktivierungsverlauf auf die irreversible Adsorption der Viren im Boden zurückgeführt werden.

Bei der Adsorption der Viren an den Boden können im Genom der Viren Schäden auftreten. Yeager et al (119,120) haben gezeigt, daß der Verlust der Infektionsfähigkeit der Viren in gesättigtem und trockenem Sand durch Schäden im Viruspartikel verursacht wird.

Die im Boden vorhandenen Bakterien können durch ihre Aktivität zur Inaktivierung der Viren beitragen. Sobsey et al (125) stellten in sterilen Proben eine längere Überlebenszeit der Viren fest als in insterilen. Sie vermuteten, daß Bakterien bei der Inaktivierung der Viren eine Rolle spielen können.

Bei der Anreicherung von Grundwasser mit unterschiedlich behandeltem Abwasser muß damit gerechnet werden, daß die Wanderungszeit der Viren ins Grundwasser

kürzer sein muß, als die Überlebensdauer der Viren im Boden.

Es ist bekannt, daß das Vorhandensein von Kationen in der Umgebung die Adsorption der Viren an den Sand verstärkt (Theorieteil). Durch die Versuche wollten wir die Frage beantworten, ob das Vorhandensein von Kationen eine zeitliche Verzögerung der Viren in der Säule gegenüber einem Tracer verursachen kann. Die Abbildungen 3 bis 5 zeigen keinen zeitlichen Unterschied zwischen der Ankunft von Viren mit und ohne Kationenzusatz, obwohl die im Eluat der Säule ankommenden Viren wesentlich reduziert waren.

Lefler et al (112) berichteten den gleichen Effekt. Sie fanden, daß eine hohe Kationenkonzentration bis zu 1500 mg/l Na^+ das Ankommen von Viren ins Eluat der Säule nicht verhindert hat.

Der Virendurchbruch in das Eluat kann auf den Wandeffekt zurückgeführt werden. Vermutlich findet trotz des Zusatzes von Kationen kein völliges Adsorptionsgleichgewicht statt, deshalb ist zu erwarten, daß ein kleiner Prozentsatz der Viren immer die Säule passiert.

Im Laufe der Versuche wurde die Temperatur als Faktor für Virendesinfektion benutzt. Es wurde vermutet, daß die Behandlung des Sandes mit warmem Wasser die Adsorptionskapazität des Sandes gegenüber den Viren verändern kann. In den Abbildungen 4-6 sieht man, daß die Temperaturbehandlung die Adsorption der Viren an den Sand verstärkt. Die Verstärkung der Adsorption durch die Temperaturbehandlung kann dadurch erklärt werden, daß an Sand adsorbierte organische Stoffe gelöst werden und damit mehr freie Stellen für adsorbierende Viren zur Verfügung

stehen.

Trotz der Temperaturbehandlung und des Kationenzusatzes passierten Viren die Säule, die im Verhältnis von 1:3 gegenüber der Kontrolle standen. Das bestätigt unsere Vermutung vom Virendurchbruch in das Eluat.

Durch Batchversuche wurde versucht festzustellen, ob höhere Temperaturen stärkeren Einfluß auf die Adsorption der Viren haben können. Aus Abbildung 6 ist zu entnehmen, daß die Behandlung mit höheren Temperaturen als 80°C und 100°C keine zusätzliche Adsorptionsverstärkung verursacht.

Bei 60°C nahm die Adsorption der Viren um einen log zu. Die gleiche Wirkung ergab sich bei höheren Temperaturen.

Für die Gewinnung von repräsentativen Ergebnissen und Folgerungen über die die Virenadsorption beeinflussenden Faktoren wurde die Adsorption der Viren unter verschiedenen Bedingungen getestet. Die Faktoren wurden zuerst in Batchversuchen untersucht.

Für die Versuche war es wichtig, ein optimales zeitliches Adsorptionsgleichgewicht zwischen den Viren und den Sandpartikeln herzustellen. Die Adsorption der Viren ist typspezifisch: Die Adsorption der beiden Virustypen tritt in kurzer Zeit auf. Bis zu 99 % der Polioviren adsorbierten innerhalb von 30 Minuten, während die Cox Bl-Viren in der gleichen Zeit zum großen Teil frei in der Suspension blieben.

Andere Forscher haben von unterschiedlichen Adsorptionsgleichgewichtszeiten berichtet. Goyal und Gerba (110) stellten eine optimale Adsorptionszeit von 30 Minuten für 9 Enterovirustypen fest. Carlson

et al (103) fanden, daß die Adsorption der Viren an den Sand bis zu 20 Minuten zunimmt und danach konstant bleibt.

Die Adsorption der Viren war von der Sandmenge abhängig. Die Zunahme der Adsorption wurde erst oberhalb von 1 g Sand erkennbar. Vermutlich reichten die eingegebenen Viren aus, um die Adsorptionsstellen zu sättigen. Die Ergebnisse zeigten, daß die Viren unterschiedlich an den Sand adsorbierten, d.h. die Adsorption ist typspezifisch. Am stärksten adsorbierten die Polioviren und am schwächsten die Cox Bl.

Wenn man davon ausgeht, daß die Virenadsorption-Desorption dem Modell des Freundlichen Isotherm folgt, erwartet man, daß die adsorbierten Viren den eingegebenen Viren proportional sein sollten. Dieses Phänomen ist in Abbildung 10 deutlich zu sehen.

Die starke Adsorptionskapazität der kolloidalen Partikel gegenüber den Viren kann auf ihre große Oberfläche und ihre Ionenaustauschkapazität zurückgeführt werden. Obwohl die Menge der kolloidalen Partikel in den Versuchen zehnmal kleiner war als die der anderen Sandfraktionen, adsorbierten sie einen größeren Anteil Viren als die anderen Fraktionen.

Zwischen Grob-, Mittel- und Feinsandfraktionen war der Unterschied sehr klein.

Da die Viren eine Proteinhülle haben, hängt ihre Ladung wesentlich vom pH-Wert der Umgebung ab. Der isoelektrische Punkt der getesteten Enteroviren liegt im saurem Bereich. Die Sandpartikel sind über einen breiten Bereich negativ geladen. Die

stärksten Adsorptionsraten wurden im sauren Bereich festgestellt. Im alkalischen Bereich war die Adsorption der Viren sehr schwach. Vermutlich liegt das an der negativen Ladung der Viren in alkalischem Milieu, durch die sich die Sandpartikel und die Viren voneinander abweisen.

Der Unterschied zwischen den Virustypen in ihrer Adsorption bei dem gleichen pH-Wert liegt wahrscheinlich an ihren verschiedenen isoelektrischen Punkten. Es ist wieder klar zu sehen, daß die Polioviren am stärksten adsorbierten und die Cox Bl am schwächsten.

Labella und Gerba (117) untersuchten die Adsorption von verschiedenen Virustypen in den gleichen pH-Bereichen wie wir und stellten unterschiedliche Adsorptionraten zwischen den verschiedenen Virustypen fest. Sie fanden aber keinen großen Unterschied in den verschiedenen Bereichen. Bei einem pH-Wert von 8 konnten Drewry et al (109) eine Abnahme von 40 % der Adsorption der Viren an den Sand feststellen.

Die Kationen können bei der Adsorption der Viren an den Sand durch die Brückenbildung zwischen den negativ geladenen Partikeln eine wesentliche Rolle spielen. Durch ihr Vorhandensein verkleinern die Kationen die Doppelschicht um die Partikel, dadurch können die van der Waal'schen Kräfte die Anlagerung der Viren an den Sand ermöglichen (102). Es wurde gezeigt, daß die Adsorption der Viren an den Sand von der Wertigkeit der Kationen abhängt. Die zweiwertigen Kationen waren effektiver als die einwertigen. Bei der gleichen Kationenkonzentration von 20 mM wurde eine ca. 5 mal höhere Adsorption erzielt bei Verwendung von zweiwertigen Kationen.

Es ist zu bemerken, daß der Einfluß von Kationen stärker auf die Adsorption von Rota SA-11-Viren als auf Polioviren war. Der Unterschied zwischen den Adsorptionsraten von Rota- und Poliovirus kann dadurch erklärt werden, daß die Polioviren ohne Kationenzusatz stärker als die Rotaviren an Sand adsorbieren. Daraus kann man schließen, daß die Kationen die Adsorption virusspezifisch verstärken und, die Adsorption von schwach adsorbierenden Viren durch den Kationenzusatz verbessert werden kann.

Als Vertreter von im Abwasser vorhandenen organischen Stoffen wurde die Huminsäure benutzt. Die Anwesenheit von Huminsäure in 0.1 - 0.05 mg/ml hat die Adsorption der Viren sehr stark gestört. Bei dieser Konzentration blieben 60 % der zugegebenen Viren frei in der Suspension. Rymond et al (117) konnten keinen Einfluß von Huminsäure auf die Adsorption von Polioviren feststellen, während unter gleichen Bedingungen die Adsorption von Echoviren 1 um 25 % herabgesetzt wurde. Bei niedrigen Huminsäurekonzentrationen kam keine Adsorptionsstörung vor. Bei höheren Konzentrationen scheint es, als ob die Huminsäure die Adsorption der Viren weniger stört. Das haben wir auf die Verklumpung der Viren in der Suspension zurückgeführt, durch die man weniger Viren im getesteten Überstand findet.

Es ist anzunehmen, daß der Einfluß von Huminsäure auf die Adsorption an Gehalt des Bodens an organischen Stoffen abhängig ist. Bei einem höheren Gehalt von organischen Stoffen kann der Einfluß stärker sein, weil die Sättigung von Adsorptionsstellen schnell und mit kleinen Mengen von organischen Stoffen erreicht wird.

Im zweiten Teil des Vorhabens wurde festgestellt,

daß bei dieser Versuchsanordnung mehr als 99 % der eingegebenen Viren unter verschiedenen Bedingungen in der Säule geblieben sind. Darüber hinaus war es für uns wichtig zu wissen, inwieweit die verschiedenen Viren unter unterschiedlichen Bedingungen in die Sandsäule eindringen. Deshalb wurden die in der Säule adsorbierenden Viren mittels Sandfraktionierung untersucht. Zusätzlich wurden im Eluat vorkommende Viren ermittelt.

Bei dem Virustransport ins Grundwasser kann u.a die Wasserqualität eine wichtige Rolle spielen. Statt einzelner Faktoren wurden hier natürliche Wasserarten mit unterschiedlicher Qualität benutzt. Aus den Abbildungen 20-23 ist zu erkennen, daß der Einfluß der Wasserqualität auf die Adsorption von Viren virusspezifisch ist.

Die Anwendung von destilliertem Wasser ergab keinen großen Unterschied zwischen den verschiedenen Virustypen und alle Viren blieben in den ersten 5 cm der Säule bis zu 99 % adsorbiert.

Im Vergleich zu destilliertem Wasser hat das Grundwasser die Adsorption der Viren verstärkt. Bei der Anwendung von Grundwasser wanderten die Viren langsamer als bei destilliertem Wasser. Den Unterschied merkte man insbesondere bei Polioviren und Echoviren 7, von denen in den ersten 2 cm der Säule bis zu 99 % verblieben. Die Verstärkung der Virenadsorption durch die Anwendung von Grundwasser kann auf dessen Ionenstärke werden.

Es ist von anderen Forschern bekannt, daß das destillierte Wasser zur Mobilisierung der Viren im Boden beitragen kann. Sie führten die Wanderung der Viren im Sand durch destilliertes Wasser auf elektrostatische

Änderungen im Milieu (pH und Ionenstärke zurück (111,126,115). Dubiose et al (111) stellten fest, daß bei der Anwendung von Abwasser mit 700-900 umhos/cm in Sandsäulen die Viren in den oberen Schichten der Säule adsorbierten, und nach einem Zusatz von destilliertem Wasser ein typischer Poliovirusdurchbruch zu beobachten war. Sie haben daraus geschlossen, daß die Veränderung der in den oberen Schichten der Säule akkumulierten Kationen die Freisetzung der Viren vom Sand erlaubte.

Im Eluat des destillierten Wassers wurden weniger als 1 % (ca. 10^5 PFU) der eingegebenen Viren nachgewiesen. Echoviren 7 waren im Eluat nicht zu ermitteln. Bei der Anwendung von Grundwasser kam kein Durchbruch der Viren vor.

Der Einfluß von organischen Stoffen wurde in den Batchversuchen durch die Benutzung von verschiedenen Huminsäurekonzentrationen untersucht, und eine deutliche Störung der Adsorption der Viren festgestellt. Außer Huminsäure kann biologisch behandeltes Abwasser eine Reihe von organischen Stoffen und Tensiden enthalten.

Durch das Vorhandensein der organischen Stoffe drangen die Viren tiefer in die Säule als bei den anderen Proben. Von den Echo 7, Polio III und Cox A9 sind 90-99 % der eingegebenen Viren in den ersten 5 cm festgestellt worden. Die Cox B1 und Rota SA-11 waren in allen Fraktionen der Säule in Portionen von 5-25 % verteilt.

Es war deutlich zu sehen, daß die Affinität der verschiedenen Viren gegenüber dem Sand unterschiedlich war und die Störung durch die im Abwasser vorhandenen organischen Stoffe virusspezifisch auftrat.

Wegen ihrer starken Adsorptionsaffinität gegenüber dem Sand wurden die Polio I, Cox A9 und Echo 7 eher im Sand verzögert als Cox B1 und Rota SA-11, deren Adsorption durch die organischen Stoffe gestört wurde.

Die Anwendung von biologisch behandeltem Abwasser erlaubte nicht nur eine tiefere Wanderung der Viren in der Säule sondern einen ständigen Virendurchbruch ins Eluat der Säule. Die im Eluat nachgewiesene Virenmenge betrug ca. 1 % der eingegebenen Viren.

Zum Vergleich wurden Wasserproben aus dem Pilotanlage aufgenommen, in dem das biologisch behandelte Abwasser durch physikalisch-chemische Verfahren behandelt wird. Durch diese Behandlung kann der Gehalt an organischen Stoffen im Abwasser wesentlich verringert werden.

Die Viren wurden stärker in den oberen Schichten der Säule zurückgehalten als bei dem biologisch behandelten Abwasser. Außer Cox B1 blieben die Viren in den ersten 5 cm adsorbiert. Das Cox B1 war in allen Fraktionen nachzuweisen.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß ein großer Teil der organischen Stoffe des Abwassers durch die weitergehende Behandlung beseitigt wurde. Da die Viren bei destilliertem Wasser stärker adsorbierten als beim weitergehend behandelten Abwasser, kann man vermuten, daß durch die weitergehende Behandlung das Abwasser nicht völlig von organischen Stoffen befreit wird.

Lance et al (107) behaupteten, daß die Virusadsorption in der mit Abwasser gefluteten Sandsäule durch

die negative Ladung der Viren beeinflusst wird, so daß Viren mit schwacher negativer Ladung sofort in den oberen Schichten der Säule adsorbieren, während Viren mit stärker negativer Ladung tiefer in die Säule wandern.

Bei allen geprüften Fließgeschwindigkeiten ist zu merken, daß mehr als 90 % der Viren innerhalb der ersten 3 cm blieben. Der Einfluß der Fließgeschwindigkeit auf die Eindringtiefe der Viren wird deutlicher, wenn man den Anteil von wiedergefundenen Viren in tieferen Fraktionen in der Säule bei den verschiedenen Fließgeschwindigkeiten vergleicht. In 5 cm Tiefe wurden z. B. mit zunehmender Fließgeschwindigkeit 0.01 %, 0.49 %, 1.42 % und 2.73 % der eingegebenen Viren wiedergefunden.

Bei niedrigen Fließgeschwindigkeiten konnten Lance et al (107) die Mobilisierung der Viren feststellen. Eine Erhöhung der Fließgeschwindigkeit von 0.6 zu 1.2 m/d verursacht eine tiefere Wanderung der Viren in der Säule. Andererseits wurde bei einer Erhöhung von 1.2 zu 12 m/d kein starker Einfluß auf die Wanderung der Viren beobachtet. Sie vermuteten, daß über und unter einem bestimmten Bruchpunkt die Fließgeschwindigkeit des Wassers die Adsorption der Viren sehr wenig beeinflussen kann. Im Vergleich zu ihren Untersuchungen haben wir keine Viren im Eluat bei den verschiedenen Fließgeschwindigkeiten nachgewiesen. Vermutlich ist der Bruchpunkt nicht nur von der Fließgeschwindigkeit abhängig sondern auch von der Sandsorte. Die in unseren Untersuchungen verwendeten Sandsorten haben eine starke Adsorptionskapazität gegenüber den Viren gezeigt.

Robeck et al (105) fanden keinen Einfluß der Fließge-

schwindigkeit unter 1.2 m/d. Sie nahmen an, daß oberhalb dieser Raten die Adsorption mit zunehmender Fließgeschwindigkeit abnimmt.

Durch die Anwendung von verschiedenen Elutionsvolumen konnte ein Zusammenhang zwischen der Durchflußmenge an destilliertem Wasser und dem Transport von Viren festgestellt werden. Das destillierte Wasser kann die Ionenstärke der Umgebung durch die Ionenverdünnung verringern, dadurch können an Sand adsorbierende Viren aus den oberen Schichten der Säule eluiert werden.

Bei Erhöhung der Wassermenge bildet sich in der Sandsäule ein Ionengradient, der die Wanderung der Viren in der Säule begünstigt. Aus den Ergebnissen ist zu ersehen, daß mit zunehmender Wassermenge der Anteil an Viren in den oberen Schichten abnimmt. Im ersten Zentimeter war der Anteil der Viren mit zunehmendem Durchflußvolumen 30 %, 6.67 % und 4.42 %, während in 3 cm Tiefe 30 %, 31 % und 44 % gefunden wurden.

Da in den Batchversuchen festgestellt wurde, daß der pH-Wert bei der Adsorption der Viren an den Sand eine wesentliche Rolle spielen kann, und bei verschiedenen pH-Bereichen die Viren unterschiedlich adsorbierten, wurde der pH-Einfluß auf die Eindringtiefe der Viren in den Sandsäulen getestet.

Aus den Ergebnissen ergab sich, daß die Zunahme im pH-Wert eine tiefere Wanderung der Viren in der Säule erlaubte, so daß die Viren in allen Fraktionen der Säule und im Eluat bei pH-Wert 8 nachzuweisen waren. Wenn man den Anteil der Viren in den verschiedenen Schichten der Säule vergleicht, wird dieses Phänomen deutlicher. Mit zunehmendem pH-Wert

wurde der Anteil der Viren in den oberen Schichten der Säule kleiner. Andererseits nahm der Anteil in tieferen Schichten der Säule zu.

Aus den Untersuchungsergebnissen geht hervor, daß ein hoher pH-Wert des durchfließenden Wassers den Transport der Viren begünstigt. Daher ist der Beschaffenheit des Ab- und Bodenwassers eine große Bedeutung beizumessen. Da die mit organischen Rückständen übersättigten Riesel- und Waldböden meistens sauer reagieren (unvollständiger Abbau und Säurefermentationen), ist eine starke Rückhaltung der Viren in derartigen Böden zu erwarten. Allerdings mag eine zu rasche Infiltration zu einer Gärung führen die so unvollständig ist, daß sie zur Senkung des pH-Wertes nicht ausreicht.

SUMMARY

Viral contamination of groundwater depends upon two major factors: 1. The survival of the viruses in the soil and in the groundwater, 2. The efficiency of the soil as a filter to retain the viruses through physico-chemical processes up to their inactivation.

The inactivation of four human enteroviruses and one semian rotavirus was observed under similar conditions as in the underground (10°C). The four enteroviruses tested (poliovirus I, coxsackievirus A9, coxsackievirus B1 und echovirus 7) represent each of the four major subgroups of the enteroviruses. It has been found that the enteric viruses survive for a long time in the ground water. After 300 days the reduction in the viruses titer was 1-2 log. Only one log of the poliovirus I and echovirus 7 inactivated and tow log of the coxsackievirus A9 and coxsackievirus B1. After 100 days the titer of the rotavirus in the groundwater was reduced by tow log and in saturated sand days the rotaviruses were completely inactivated within 60 days. The rapid inactivation of rotavirus in saturated soil can be due to the irreversible destruction in the virion through irreversible adsorption onto the soil.

The effect of the presence of cations in the percolated water on the breakthrough of the viruses was investigated. This experiment was designed to answer the question whether the presence of the cations cause a temporal delay of the viruses in the soil column. It has been found that the presence of cations enhances the adsorption of the viruses, and the amount of viruses detected in the effluent in the

presence of 2 mM NaCl was 5 times less than the value obtained with distilled water. No temporal delay of the viruses was observed. 95-99 % of the viruses were adsorbed in the column. In order to obtain a column free of viruses 60°C distilled water was allowed to percolate in the column. After this treatment all the viruses in the column were inactivated.

The effect of the temperature treatment upon the adsorption capacity of the sand was investigated in both Batch and column. It has been found that treatment of the soil with warm water (60°C) enhances the adsorption of the viruses onto the soil, the amount of the viruses detected in the eluant was 3 times less than that treated with 20°C water. In batch experiments the amount of the adsorbed viruses was increased by one log. The enhancement of the viruses adsorption onto the soil through the temperature treatment can be due to the washing off of organic material from the surface of the soil, in this manner a greater number of free adsorption sites may be exposed to the viruses.

The kinetic pattern of the viruses' adsorption onto the soil was tested. The viruses adsorbed on the soil within a short time on the soil, after 30 min the amount of adsorbed viruses was constant. 99 % of the poliovirus I adsorbed in the first 30 min. 30 min were taken as the time for the rest of the batch experiments. It has been found that the adsorption of the viruses depends on the sand amount used, and the difference was observed only over 1 gramm of sand. The amount of the adsorbed viruses was proportional to the input titer of viruses and follows the Freundlich isotherm.

Between the different sand sorts course, middle and fine sand, no major difference in their adsorption capacity was observed. Although the amount of the colloidal particles used was ten times less than that of the others, they show a stronger capacity of adsorption toward the viruses in comparison with the other sand sorts.

It has been found that the pH value of the environment effects the adsorption of the viruses onto the soil strongly, at pH-5, 99.9 % of the viruses adsorbed on the sand while the adsorption at pH-8 was poor. The cations studied were monovalent and divalent. In the presence of the divalent cations (Ca^{++} and Mg^{++}) the adsorption of the viruses increased by five times than the value obtained with monovalent cations (Na^+ and K^+). In the presence of humic acid in the suspension in concentrations between 0.1-0.05 mg/ml the adsorption of the viruses was strongly reduced, at these concentrations about 60 % of the viruses were free in the suspension. In concentrations less than 0.05 mg/ml the effect of humic acid was weak or no effect was observed.

It is to be emphasised that the tested viruses demonstrated varied adsorption patterns depending on the virus type. It was found that the poliovirus I was the best adsorbent and the the adsorption of coxsackievirus B1 was the poorest. No virus type can be taken to represent the various viruses in the adsorption studies.

It was found that the movement und penetration of the viruses in the soil depends strongly on the composition of the percolated water. The highest penetration was observed upon the application of

the secondary treated sewage and the lowest was upon groundwater. The high concentration of organic material in the secondary treated sewage could be the major factor responsible for the movement of the viruses in the soil column. The ionic strength of the groundwater enhanced the adsorption of the viruses in the upper fractions of the column. We noted also that the adsorption pattern of the various virus types was different. We found that the adsorption behaviour of the polio I, echo 7 and cox A9 were similar in all the experiments. With application of wastewater the adsorption of cox B1 and rotavirus was poorer than that of the other viruses. Therefore they penetrated deeper in the column than the other viruses. In the effluent of the secondary treated sewage 1 % of the viruses was detected, which can be considered as a breakthrough of the viruses.

The relationship between water velocity and virus penetration was also investigated. The velocities tested were 0.5 m/d, 1 m/d, 2 m/d and 5 m/d. The increase in velocity allowed for a deeper penetration of the viruses in the column. In the 5th fraction the portion of the viruses was 0.05 %, 0.49 %, 1.42 % and 2.73 %, respectively. In an attempt to estimate the penetration of the viruses in 50 days' application it was found that at a velocity of 0.5 m/d less than 1 % of the viruses were able to reach a distance of 80 cm and at 5 m/d less than 1 % of the viruses cover a distance of 12 m in 50 days.

The increased volume of percolated water caused the movement of the viruses to the deeper fractions in the column. It simultaneously decreased the portion of the viruses found in the upper fractions of the column. The volumes of water applied were 2,

5 and 10 liters the portion of the viruses in the 3rd fraction was 30 %, 31 %, and 44 %, respectively. The estimation of the 50 days penetration distance which could be reached by less than 1 % of the viruses, there was no correlation between the elution volume and the distance could be covered. We speculated that the calculation accuracy improves with the increase of the elution volume.

It has been found that high pH values like 8 allow the penetration of viruses into deeper fractions of the column than do the lower values. The increase of the pH value caused a reduction of the adsorbed viruses in the upper fractions of the column and the opposite was found in the deeper fractions. The pH values tested were 5, 7 and 8. In the first fraction the portion of the viruses was 34 %, 30 % and 10 %, and in the 3th fraction 12 %, 30 %, and 23 %, respectively. With the application of water at pH 8 a breakthrough of the viruses was detected in all the eluant fractions. The estimated distance that could be reached by less than 1 % of the viruses in 50 days was 3 m at pH 5 and about 6 m at pH 8.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Primavasi, C.A. (1971).
Die Virologie in ihrer Bedeutung für Wasserhygiene.
Oeff Gesundheits Wes 33 pp: 330-336.
2. Buras, N. (1976).
Concentration of Enteric Viruses in Wastewater
and Effluent : A Two Year Survey.
Water Res. 10 pp: 295-298.
3. Steinmann, S. (1977).
Nachweis von Viren im Ostseewasser.
Zentralbl Bakterio (Orig) 164 pp: 492-497.
4. Nestor, I., et al (1978)
Enteric Viruses in Danube River ; Water and
Sludge. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.
22 pp: 144-150.
5. Melnick, J.L. (1976).
Viruses in water in G.Berg, (ed) in virus in
water. pp.3-11.
6. Dennis J.M. (1959).
1955-1956 Infectious Hepatitis Epidemie in Delhi
India. J.Amer. Water Works Ass. 51 pp: 1288-1296.
7. Berg, G. (1965).
Die Virusübertragung auf dem Wasserweg.
Arch.Hyg.Bakt. 49 pp: 310-334.
8. Shuval, H.I., Cymbalista, S., Fattal, B., Goldblum, N.
(1967).
The Concentration of Enteric Viruses in Water

by Hydroextraction and Two-phase Separation.
In Transmission of Viruses by The Water Route,ed.
Berg, G. Interscience, New York

9. Jawetz,E. Melnick,J.L.,Adelberg,E.A. (1976).
Review of Medical Microbiology. Lang Medical
Publication.
10. Siegl,G. and Frosiver,G.G. (1978).
Characterization and Classification of Virus
Particles Associated Hepatitis A. I: Size
Density and Sedimentation.
Journal of Virology. 26 pp:40-47.
11. Krugman,S.R.Ward and Giles,J.P (1963).
Studies on Natural History of Infectios Hepatitis.
pp: 159-177 in: M.Pollard (ed) perspectives
in virology III Harper and Row, New York.
12. Piazza,M., Distasio,G. and Marzano,L. (1973).
Hapatitis B Antigen Inhibitor in Human Feces
and Intestinal Mucosa, J.Br.Med. 2 pp: 334-337.
13. Fox,J.P, Brandt,C.D., Wassermann,F.E., Hall,C.E.,
Spigland,I., Deutsch,D.M., kogon,A. and Elreback,L.
R.(1969).
The Viruses Watch Program. A Continuing Surveillance
of Vviral Infections in Metropolitan New York
Families VI. Observations as to Viral Excretion,
Seroresponse, Intrafamilial Spread and Illness
Association in Adenovirus Infections.
Amer.J.Epidemiology. 89:25-50.
14. Lund,E., Hedstom,C.E. and Strannegard,O.(
1966).
A comparison between virus isolations from
sewage and from fecal specimants from patients.

Amer.J.Epidemiol. 84: 282-286.

15. Martin,G. (1976).
Epidemiological indicators for transmission
of viruses by water in G.Berg (ed) in viruses
in water pp: 70-85.
16. Albrey,M.B. and Morphy,A.M. (1976).
Rotavirus growth in bovine monolayers
Lancet 1 pp: 225.
17. Bruce-White,G.B., Ashton,C.I, Roberts,C. and
Parry,H.E. (1974).
" Rotavirus" in gastroenteritis, Lancet 2
pp: 726.
18. Davidson,G.P., Bishop,R.Z., Towuley,R.R.W.,
Holmes,I.H and Ruck,B.J. (1975).
Importance of a new virus in acute sporadic
enteritis in children, Lancet 1 pp: 242-245.
19. Katzenelson,E. (1976).
Concentration and Identification of viruses
from sea water. Rev.Int.Oceanogr.Med. Tome
XLVIII pp.9-16.
20. Bitton,G. (1980).
Introduction to Environmental Virology.
A Wiley Interscience Publication, John Wiley
and Sons.
21. Melnick,J.I. (1976).
Enteroviruses, in Viral Infections of Human
Epidemiology and Control. Plenum Medical Book
Company, New York, London.

22. World Health Organization WHO Weekly Epidemiological Records during the 1960_s and 1970_s.
23. Hawley, H.B., Morin, P.P., Geraghty, M.E., Tomkow, J. and Philips, C.A. (1973).
Coxsackie B epidemic at a boys' summer camp.
Isolation of virus from swimming water.
J.Am.Med.Assoc 226 pp:33-36.
24. Nishmi, M. and Yodfat, Y. (1973).
Successive overlapping outbreaks of a febrile illness associated with Coxsackievirus type 4 and Echovirus type 9 in a Kibbutz.
Israel. J.M.Sci. 9 pp: 895-899.
25. Couch, R.B., Douglas, R.G., Lindgern, J.R., Gerone, K.M and Knight V. (1970).
Airborne transmission of respiratory infection with Coxsackievirus A type 21.
Amer.J. Epidemiol. 91 pp:78-86.
26. Mirkovic, R.R., Kono, R.Y., Sohler, R., Schmidt, N.J. and Melnick, J.L. (1973).
Enterovirus type 70: the etiology agent of pandemic acute haemorrhagic conjunctivitis.
Bull.WHO 49 pp:341-346.
27. Craun, G.F. (1979).
Waterborne Disease - A status Report emphasizing outbreaks in Ground-Water systems.
Ground Water 17 pp:183-191.
28. Craun, G.F. and McCabe, L.F. (1973).
Review of the causes of Waterborne-Disease Outbreaks.
J.Amer.Water Works Ass. 65 pp:1-74.

29. Taylor,F.B., Eagen,J.H., Smith,D. and Coene,R.F
(1966).
The case for waterborne IH.
Amer.Journal of Public Health 56:12 pp:2093-2105.
30. Foy.H.M., Cooney,M.K and Hutten,J.B. (1968).
Adenovirus type 3 epidemic associated with
intermittent
chlorination of swimming pools.
Arch.Environ.Health 17: 795-802.
31. Merson M.H., Barker,W.H., Craune,J.F. and
McCaBe,L.J. (1974).
Outbreaks of waterborne disease in the United
States 1971-1972.
J. Infected Dis. 129 pp: 614.
32. Major,A.P., Duttweiler,D.W and Moser,R.H.
(1956).
An Apparently waterborne outbreak of Infectious
Hepatitis.
Journal of Public Health 46 pp: 1008-1027.
33. Mosley,J.W. (1965).
Transmission of Viral Diseases by Drinking
Water, Berg,G., ed. Tansmission of Viruses
by the Water Route, pp: 5-23.
John Wiley and Sons, New York.
34. Gertner,H. (1967).
Retention and Recovery of Polioviruses on
a Soluble Ultrafiltration. In G.Berg (ed)
Transmission of Viruses by the Water Route,
pp: 121-127.
John Wiley and Sons, New York.
35. Aderson,N.G., Cline,G.B., Harris,W.W. and

- Green, J.G (1967).
Isolation of viral particles from large fluid volumes. In G.Berg (ed) Transmission of viruses by water the route, pp: 75-88.
John Wiley and Sons, New York.
36. Wallis, C. and Melnick, J.L. (1967).
Concentration of Enteroviruses on Membrane filters.
J.Virology 1 pp: 472-477.
37. Wesslen, T., Albertson, P.A. and Philipson, L (1959).
Concentration of animal viruses using two-phase systems of aqueous polymer solutions.
Arch.Ges.Virusforsch. 9 pp: 510-520.
38. Wallis, C and Melnick, J.L. (1967).
Concentration of Viruses from sewage by adsorption on Millipore membranes.
Bull WHO 36: 219-225.
39. Mix, T. (1974).
The physical chemistry of membrane interaction.
In Developments in industrial Microbiology
Vol. 15 pp: 136-142 American Institute of Biological Sciences, Arlington, Va.
40. Wallis, C. et al (1972).
Enteroviruses concentration on cellulose membranes.
App. Microbiol. 23 pp: 476- 480.
41. Metcalf, T.G., et al (1974)
Environmental Factors influencing isolation of Enteroviruses from polluted surface waters.
App. Microbiol 27 pp: 920-926.
42. Katzenelson, E., Fattal, B and Hostoresky, T.

- (1976).
Organic Flocculation: An efficient second-step concentration method of the detection of viruses in tapwater.
App. Environ. Microbiol. 32 pp: 638-639.
43. Jakubowski, W., Hill, W.F and Clarke, N.P. (1975).
Comparative study of four Microporous Filters for concentrating viruses from drinking water.
App. Microbiol. 30 pp: 58-65.
44. Hill, W.F., Jakubowski, W., Akin, E.W. and Clarke, N.A. (1976).
Detection of virus in water, sensitivity of the Tentative standard method for drinking water.
App. Environ. Microbiol. 31 pp: 254-261.
45. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 15th ed., APHA, Washington, D.C. (1980).
46. Sobsey, M.D. and Jones, B.L. (1979).
Concentration of enteroviruses from Tapwater using positively charged Microporous Filters.
App. Environ. Microbiol. 37 pp: 588-595.
47. Change, L.T., Farrah, S.R. and Bitton, G. (1981).
Positively charged filters for virus recovery from wastewater treatment plant effluents.
App. Environ. Microbiol. 42 pp: 921-924.
48. Gerba, C.P., Farrah, S.R., Goyal, S.M., Wallis, C and Melnick, J.L. (1978).
Concentration of enteroviruses from large volumes of Tapwater, treated sewage and seawater.
App. Environ. Microbiol. 38 pp: 540-548.

49. Nupen,E.M, Basson,N.C. and Grabow,W.O.K. (1980).
Prog.Water Technol 12 pp: 851-863.
50. Albertsson,P.A. (1958).
Particle fractionation in liquid two-phase
systems.
Biochim.Biophys.Acta 27 pp: 378-395.
51. Roger,S.F. and Philip,C.L. (1978).
Recycling of water for irrigation: Persistence
of enteroviruses in sewage effluent and natural
waters receiving the effluents.
Water, Air and Soil Pollution 9 pp: 213-226.
52. Rao,O.C., Lakhe,P.B., Waghmore,S.W. and Dube,P.
(1977).
Virus removal in activated sludge sewage treatment.
Prog.Water Technol 9 pp: 113-127.
53. Melnick,J.L. and et al (1978).
Viruses in Water.
Bull.WHO 56 pp: 499-508.
54. Louise,G.I. and Smith,F.A (1981).
One-Year Survey of Enteroviruses, Adenoviruses
and Reoviruses isolated from effluent at an
activated-sludge purification plant.
App.Environ.Microbiol. 41 pp: 51-59.
55. Hermann,J. and Koehn,E. (1981).
Virologische Stuhl- und Abwasseruntersuchungen
in Berlin.
Öff.Gesundh.-Wesen 43 pp: 322-325.
56. Clarke,N.A., Stevenson,R.E., Change,S.L.,
Kabler,P.W. (1961).

Removal of enteric viruses from sewage by
activated sludge treatment.

Amer.J.Public Health 51 pp:1118.

57. Mack,W.N., Frey,J.R., Riegler,B.J. and Mallmann,W.L.
(1962).

Enteroviruses removal by activated sludge
treatment.

Water Poll.Cont.Feder. 34 pp:1133.

58. Bloom,H.H., Mack,W.N., Krueger,B.J. and Mallmann,W.L.
(1959).

Identification of enteroviruses in sewage.

J.Infect.Dis. 105: 61.

59. Berg,G. (1973).

Removal of Viruses from Sewage, Effluents
and Waters.

I.A.Review Bull. WHO 49 pp: 406-451.

60. Shuval,H.I. (1969).

Detection and Control of Enteroviruses in
the Water Environment. In Development in Water
Quality Research. ed, H.I.Shuval. pp: 47-71

61. Chaudhuri,M. and Engelbrecht,R.S. (1970).

Removal of viruses from water by Chemical
Coagulation and Flocculation.

J.Amer.Water Works Ass. 62 pp: 563.

62. England,B., Leach,R.E., Adame,B. and Richio,S.
(1968).

Virology Assessment of Sewage Treatment at
Santee California in Berg G. (ed), Transmission
of viruses by the water route.

John Wiley and Sons, New York pp: 401.

63. Kelly, S., Sanderson, W.W. and Neidl, C. (1961).
Removal of Enteroviruses from Sewage by Activated
Sludge.
J.Wat.Pollut.Control.Fed. 33 pp: 1056.
64. Gilcraes, F.W. and Kelly, S.M. (1955)
Relation of Coliform test to Enteric-virus
Pollution.
J.Amer.Water Works Ass. 47 pp: 683.
65. Change, S.L., Stevenson, R.E., Bryant, A.R.,
Woodward, R.L. and Kabler, P.W. (1958a).
Removal of Coxsackie and bacterial viruses
in water by flocculation - 1. Removal of
Coxsackie and bacterial viruses in water of
known chemical content by flocculation with
aluminum sulfate or ferric chloride under
various testing conditions.
Amer.J.Public Health, 48 pp: 51.
66. Berg, G., Dean, R.B and Dahling, D.R (1968).
Removal of Poliovirus I from secondary effluent
by lime flocculation.
J.Amer.Water Works Ass. 60 pp: 193-198.
67. Manwaring, J.F., Chaudhuri, M., Engelbrecht, R.S.
(1971).
Removal of viruses by coagulation and flocculation.
J.Amer.Water Works Ass. 63 pp: 298.
68. Morris, J.C. (1966).
Future of Chlorination.
J.Amer.Water Works Ass. 58 pp: 1475.
69. Kelly, S.W. and Sanderson, W.W. (1958).
The effect of chlorine in water on enteric
viruses.

- J.Amer.Public Health, 48 pp: 1323-1334.
70. Kelly,S.M. and Sanderson,W.W. (1960).
The effect of Chlorine in water on enteric
viruses.
II The effect of combined Chlorine on poliomyelitis
and coxsackievirus.
J.Amer.Public Health, 50 pp: 1-14.
71. Fair,G.M. and Morris,J.C. (1948).
The behavior of chlorine as a water disinfectant.
J.Amer. Water Works Ass. 40 pp: 1051.
72. Liu,O.C. and McGowan,F. (1973).
Effect of chlorination on human enteric viruses
in partially treated water from the Potomac
River estuary. Study report prepared for the
U.S.A. Army Division. North Atlantic.
73. Clarke,N.A. and Kabler,P.W. (1954).
The inactivation of purified Coxsackie virus
in water by chlorine.
Amer.J.Hyg. 59:119.
74. Hejkal,T.W., Wellings,F.M., Larock,P.A. and
Lewis,A.L. (1979).
Survival of Poliovirus within organic solids
during chlorination.
App.Environ.Microbiol. 38 pp: 114-118.
75. Gerba,C.P. and et al (1975).
Viruses in Water : The Problem, some Solutions
Environ. Sci. Technol. 9 pp: 1122-1126.
76. Coin,L., Menetrier,M.L., Lobonde,J. and Hannoun,M.C.
(1965).
"Modern Microbiological and Virological Aspects

of Water Pollution". Advances in water pollution research, Proceedings of the second International Conference. Jaag, O. and Boors, J.K. ed., Oxford: Pergamon press.

77. Farrohi, K. (1966).
" Research on viruses in water" Experimental studies. Consequences of these studies in problems of General Hygiene" Review Immunology Therapie Antimicrobienne 30:6 pp: 355-356.
78. Metcalf, T.G and Stiles, W.C. (1968).
" Viral Pollution of Shellfish in Estuary Waters"
J. Sanitary Engineering Division ASCE, 94 pp: 595-609.
79. Lamb, G.A., Chin, T.D.Y. and Scarce, L.E. (1964).
Isolation of Enteric Viruses from Sewage and River in Metropolitan Area
Amer. Journal of Hygiene 80 pp: 320-327.
80. Grinstein, S., Melnick, J.L. and Wallis, C. (1970).
Virus Isolations from Sewage and from Streams Receiving Effluents of Sewage Treatment Plants
Bull of WHO 42 pp: 291-296.
81. Walter, R. und Rüdiger, S. (1974).
Die Kommunalhygienische Bedeutung von Virusisolierung aus Oberflächengewässern.
Z. Gesamte Hyg 20 pp: 691-699.
82. Taylor, E.W. (1969).
Forty-third Report on the Results of Bacteriological, Chemical, and Biological Examination of the London Waters 1967-1968.
Metropolitan Water Board, London .

83. Akin,E.W., Benton,W.M. and Hill,W.F (1971).
Enteric Viruses in Ground and Surface Waters
: A Review of their Occurrence and Survival.
Proceeding, 13th water Quality Conference,
Uni. of Illinois,urbanechampaign, U.S.A.,
pp: 59-74.
84. Cioglia,L. and Loddo,B.
The Process of Self-Purification in Marine
Environment, III Resistance of some Enteroviruses.
Nuovi Annali Di Igiene E. Microbiologie,1B
(162), pp: 11-29.
85. Clarke,N.A., Berg,G., Kabler,P.W. and Chang,S.L
(1964).
Human Enteroviruses in Water : Source ,Survival
and Removability. Conference on Water Pollution
Research, London. Pergamon Press, New York.
86. Benard,M.A. (1973).
Land disposal and sewage effluent : appraisal
of health effects of pathogenic organisms.
J.Amer.Water Works Ass. 65 pp: 432-440.
87. Gerba,C.P., Wallis,C and Melnick,J.L. (1975).
Fate of wastewater bacteria and viruses in
soil.
J.irrig,Drain.Div.Am.Soc.Civ.Eng. 101 pp:
167-174.
88. Mack,W.N., Lu,Y.S and Coohon,B. (1972).
Isolation of Poliomyelitis virus from a contaminated
well.
Health Serv.Rep. 87 pp: 271-274.
89. Wellings,F.M., Mountian,C.W. and Lewis,A.L.

- (1977).
Virus in Groundwater in individual on-site
wastewater systems. In I.McClelland (ed) proceedings
of the second National conference Ann.Arbor
Science Publisher Inc.Ann Arbor, Mich. pp:
61-65.
90. Vaughn,J.M. and Landery,E.F. (1978).
The occurrence of human enteroviruses in Long
Island Groundwater aquifer recharged with
tertiary wastewater effluents. In Mckim,H.L.
(ed) State of Knowledge in land treatment
of wastewater. pp: 233-243.
91. Vaughn,J.M., Landrey,E.F., Baranosky,L.J.,
Beckwith,C.A., Dahl,M.C. and Delihis,N.C.
(1978).
Survey of human virus occurrence in
wastewater-recharged ground-water on Long Island.
App.Environment.Microbiol.37 pp: 47-51.
92. Schaub,S.A. and Sorber,C.A. (1977).
Virus and bacteria removal from wastewater
by rapid infiltration through soil.
App.Environment.Microbiol. 33 pp: 609-619.
93. Koerner,E.A. and Haws,D.A (1979).
Long-term effects of land application of domestic
wastewater. Environmental Protection Agency
Report 600/12-79 047 Ada.Oklahoma
94. Walter,R. und Rüdiger,s. (1977).
Untersuchungen zum Virus Vorkommen im Grundwasser.
Z. Gesamte Hyg. 23 pp: 461-463.
95. Marzouk,Y. etal (1979).
Prevalence of Enteroviruses in Ground water

of Israel.

Ground Water 17 pp: 487-491.

96. Otis, J.S. (1976).
Removal of Viruses by Treatment Processes.
In Berg, G., (ed) Viruses in Water, pp: 167-179.
97. Nestor, I. and Costin, I. (1976).
Presence of certain Enteroviruses (coxsackie)
in sewage
Effluents and in River waters in Romania.
J. Hyg. Epidemiol. Immunol. 20 pp: 137-149.
98. Nupen, E.M., Bateman, B.W. and McKenny, N.C.
(1974).
The Reduction of viruses by the various unit
Processes used in the Reclamation of sewage
to potable water in waste water systems
(Malina, J.F. and Sagik, P.B. editors) Ctr. for
Res. in Wtr. Resources Uni. of Texas Austin
Tex., pp: 107-114.
99. Hoehn, R.C. et al (1977).
Trihalomethanes and Viruses in a water supply.
J. Environ. Eng. Div. 103 pp: 803-814.
100. Plotkin, S.A. and Katz, M. (1967).
Minimal Infective Doses of Viruses for man
by the oral Route. In Transmission of viruses
by the water routes, Berg, G. (ed) Intersciences,
London.
101. Sproul, O.J. (1976)
In G. Berg, H.L. Bodily, E.H. Lennette, J.L. Melnick
and T.G. Metcalf. Eds. Viruses in water, American
Public Health Association Washington D.C
pp: 167-179.

102. Bitton, G. (1975).
Adsorption of Viruses onto Surfaces in Soil
and Water.
Water Res. 9 pp: 473-484.
103. Carlson, G.F., Woodard, F., Wentworth, D. and
Sproul, O. (1968).
Viruses inactivation on clay particles in
natural waters.
J.Wat.Pollut.Control Fed. 40 pp: R 89-106.
104. Moore, R.S., Taylor, D.H., Sturman, L.S., Reddy, L.L.
and Fuhs, W (1981).
Poliovirus Adsorption by 34 Minerals and
Soils.
App.Environ.Microbiol. 42 pp: 963-975.
105. Robeck, G.G., Clarke, N.A. and Dostal, K.A. (1962).
Effectiveness of water treatment processes
in virus removal.
J.Amer.Water Works Ass. 54 pp: 1275-1290.
106. Vaughn, J.M., Landry, E.F., Beckwith, C.A. and
Mcharvell, Z. (1981).
Virus removal during groundwater recharge
: Effects of infiltration rate on adsorption
of poliovirus to soil.
App.Environment.Microbiol. 41 pp: 139-147.
107. Lance, G.C. and Gerba, C.P (1980).
Poliovirus movement during high rate land
filtration of sewage water.
J.Environ.Qual. 9 pp: 31-34.
108. Schaub, S.A. and Sorber, A.C. (1977).
Virus and bacteria removal from wastewater

- by rapid infiltration through soil.
App.Environ.Microbiol. 33 pp: 609-619.
109. Drewry, W.A. and Eliassen, R. (1968).
Virus movement in groundwater.
J. Water Pollut. Control Fed. 40 pp: R257-271.
110. Goyal, S.M. and Gerba, C.P. (1979).
Comparative Adsorption of Human Enteroviruses, Simian
Rotavirus and Selected Bacteriophages to
Soils.
App.Environ.Microbiol 38 pp: 241-247.
111. Duboise, S.M., Moore, B.E. and Saigk, B.P. (1976).
Poliovirus survival and movement in a sandy
forest soil.
App.Environ.Microbiol. 31 pp: 536-543.
112. Lefler, E. and Kott, Y. (1974).
In Malina, J.F. and Saigk, B.P., Ed,
virus survival in water and wastewater systems.
U.P Austin pp: 81-84.
113. Puck, T.T. and Tolmach, L.J. (1954).
The mechanism of virus cells IV Physicochemical
studies on virus and cell surface groups.
Arch.Biochem.Biophys. 51 pp: 229.
114. Wellings, F.M., Lewis, A.L., Mountian, C.W.
and Pierce, L.V. (1975).
Demonstration of virus in groundwater after
Effluent discharge onto soil.
App.Microbiol. 29 pp: 751-757.
115. Lance, J.C., Gerba, C.P. and Melnick, J.L. (1976).
Virus Movement in soil columns flooded with

- secondary sewage Effluent.
App.Environ.Microbiol. 32 pp:520-526.
116. Lo,S.H. and Sproul,O.J. (1977).
Poliovirus Adsorption from water onto silicate
minerals.
Water Res. 11 pp: 653-658.
117. Raymond L.L. and Gerba,C.P. (1979).
Influence of pH, Salinity and organic Matter
on the Adsorption of Enteric Viruses to Estuarine
sediment.
App.Environ.Microbiol 38 pp: 93-101.
118. Landry,E.E., Vaughn,J.M., Thomas,M.Z. and
Beckwith,C.A. (1979).
Adsorption of enteroviruses to soil cores
and their subsequent elution by artificial
rainwater.
App.Environ.Microbiol. 38 pp: 680-687.
119. Yeager,J.G. and O'Brien,R.T. (1979).
Enteroviruses Inactivation in Soil.
App.Environ.Microbiol. 38 pp: 694-701.
120. Yeager,J.G. and O'Brien,R.T. (1979).
Structural changes associated with poliovirus
inactivation in soil.
App.Environ.Microbiol. 38 pp: 702-709.
121. Clark,S.M., Barnett,B. and Spendlove,R.S.
(1979).
Production of high-titer bovine Rotavirus
with trypsin.
J.Clin.Microbiol. 4 pp: 413-417.
122. Matsuno S., Inouye,S., and Kono,R. (1977).

- Plaque-assay of neonatal calf diarrhea virus
and neutralizing antibody in human sera.
J.Clin.Microbiol. 5 pp: 1-4.
123. Ramia, S. and Satter, A.S. (1979).
Simian Rotavirus SA-11 plaque formation in
the presence of trypsin.
J.Clin.Microbiol. 10 pp: 609-614.
124. Matzeß, G. (1980).
Untersuchungen der Lebensdauer von Bakterien
und Viren im Grundwasser im Hinblick auf
die Ausweisung von Schutzgebieten für die
Grundwasseranlagen.
A: Hydrologische Untersuchungen Forschungsbericht
des Geol.Paläontol.Inst.der Univer. Kiel
ss: 78-88.
125. Sobsey, M.D., Dean, C.H., Knuckless, M.E. and
Wagner, R.A. (1980).
Interactions and survival of Enteric Viruses
in Soil Materials.
App.Environ.Microbiol. 40 pp: 92-101.
126. Gerba, C.P. and Lance, J.C. (1978)
Poliovirus removal from primary and secondary
sewage effluent by soil filtration.
App.Environ.Microbiol. 36 pp: 247-251.

Lebenslauf

Name	Nasser Abdelfatah
Eltern	Mohammed Nasser und Halima Nasser, geb in Tira/Israel.
16.8.1957	geboren in Tira/ Israel
1962- 1968	Grundschule
1969- 1972	Realschule
1973- 1975	Gymnasium
1975	Bagrut (Abitur)
1976- 1978	Biologie-Studium an der Hebrew University of Jerusalem in Jerusalem
7.1978	B.Sc of Biology
1979- 1980	Studium der Human Environmental Sciences in Jerusalem
12.1980	M,Sc of Human Environmental Sciences
6.1981- 8.81	Stipendium des DAAD in der Bundesrepublik, im staatlichen Medizinalunter- suchungsamt, in Braunschweig
Ab WS 1982	Aufbau-/ Promotionsstudium an der Freien Universität Berlin

